

Efecto de los retinoides en la diferenciación del trofoblasto humano en cultivo

ALFONSO MARTÍNEZ FLORES,^a
 LAURA ORTEGA CALDERÓN,^{a,b} ALICIA ORTEGA AGUILAR,^{c,e}
 ROLANDO MAIDA CLAROS,^d JORGE BELTRÁN MONTOYA,^d
 FELIPE VADILLO-ORTEGA^{a,b}

RESUMEN

Objetivo: El presente estudio analiza el efecto de diferentes retinoides sobre la función y diferenciación celular del trofoblasto humano en cultivo.

Material y métodos: Se realizó un estudio experimental *in vitro*, en donde se utilizaron vellosidades coriónicas y células de citotrofoblasto obtenidas de placentas de término de embarazos normales, que fueron cultivadas y estimuladas con concentraciones fisiológicas diferenciales de retinol (ROL), ácido 9-cis retinoico (CRET) y ácido *all-trans* retinoico (TRET). Se analizaron los cambios en la actividad de la metaloproteínasa-9 (MMP-9) y la metaloproteínasa-2 (MMP-2), además de documentar las condiciones óptimas para el cultivo. En una segunda fase, se estimularon células de citotrofoblasto (CTB) aisladas y se documentaron los cambios morfológicos de formación de sincicio *in vitro* al ser estimulados con los retinoides mencionados.

Resultados: Los explantes de placenta respondieron en forma dosis dependiente, en la actividad de MMP-2 y MMP-9 cuando fueron incubados en presencia de ROL y en menor proporción cuando se incubaron con CRET y TRET. El CTB aislado y estimulado con ROL y CRET formó sincicio en un lapso de 48 horas, en tanto que los estimulados con TRET lo hicieron hasta el 40. día de incubación.

Conclusiones: La placenta y el trofoblasto aislado responden a los diferentes retinoides. La respuesta del CTB al ROL indica que el CTB cuenta con la maquinaria metabólica para transformar el retinol en CRET y TRET que tienen actividad biológica. El efecto de estos compuestos se pudiera expresar en la función de implantación y en la placenta en desarrollo.

PALABRAS GUÍA: Explantes de placenta, retinoides, citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto, metaloproteínasa 9, metaloproteínasa 2.

^aDirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología "Dr. Isidro Espinosa de los Reyes" (INPer).

^bDepartamento de Salud, Universidad Iberoamericana.

^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, INPer.

^dDepartamento de Tococirugía y Urgencias, INPer.

^eDepartamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Correspondencia:

Dr. Felipe Vadillo-Ortega

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

Dirección de Investigación

Montes Urales 800, Lomas de Virreyes

C.P. 11000, México, D.F.

Tel.: 5202-9381

Fax: 5520-0034

Correo electrónico: felipe.vadillo@uia.mx; fvadillo@servidor.inper.edu.mx

Recibido: 23 de junio de 2005.

Aceptado: 17 de agosto de 2005.

INTRODUCCIÓN

La familia de la vitamina A está conformada por sus metabolitos llamados de manera conjunta retinoides (retinol, retinal, ácido 9-cis retinoico y ácido *all-trans* retinoico). Los retinoides son nutrientes indispensables en el crecimiento y participan en la modulación de la morfogénesis y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario.^{1,2} El ácido retinoico (RA), principal retinoide con actividad biológica, interactúa en la regulación de la expresión de genes de proteínas como hormonas y factores de crecimiento (hormona



de crecimiento y factor de crecimiento transformante- β 2), receptores/factores nucleares (RAR β , c-fos, AP-2), receptores de interleucinas (IL-2 y IL-6) y de enzimas como algunas metaloproteasas de matriz extracelular.³

El desarrollo de la placenta humana depende que el trofoblasto, que rodea al blastocisto, se adhiera e invada la pared uterina y progrese hasta llegar a las capas más profundas del endometrio donde establece comunicación con la circulación materna.⁴ La invasión termina al alcanzar la zona en que se encuentran las arterias espirales, que son remodeladas,⁵ de esta manera, se establece el intercambio de nutrimentos entre la madre y el producto.⁶ La progresión de estos eventos depende de fenómenos sucesivos de diferenciación del trofoblasto, que debe manifestar fenotipos funcionales compatibles con cada etapa.

A pesar de que se ha establecido que los retinoides son indispensables durante estas fases tempranas del embarazo humano, se ha estudiado de modo muy preliminar el papel que juegan en el desarrollo y función de la placenta. Se han reportado cambios en la distribución espacial de los receptores de retinoides durante el proceso de diferenciación del citotrofoblasto a sinciotrofoblasto al ser estimulado con ácido retinoico y algunos de sus isómeros. Los resultados de estos estudios sugieren que el ácido retinoico y algunos de sus isómeros participan en este proceso de diferenciación y modulan la expresión de los receptores RAR y RXR en el sinciotrofoblasto. Asimismo, se ha demostrado que el efecto de los retinoides sobre la diferenciación del trofoblasto puede estar mediado a través de la inducción de hormonas, como la gonadotropina coriónica humana y la leptina, que son producidas de manera creciente durante la diferenciación del trofoblasto a sinciotrofoblasto.⁷⁻⁹ Por otro lado, se ha visto que el ácido retinoico y algunos de sus isómeros son capaces de modular al elemento de transcripción AP-1 presentes en algunos genes de metaloproteasas, como la MMP-1 (colagenasa intersticial), MMP-3 (estromelina 1),

MMP-9 (colagenasa tipo IV-92 kD, gelatinasa B), MMP-10 (estromelina 2).¹⁰ Este grupo de enzimas son indispensables para el proceso de invasión.

En la preeclampsia la invasividad del trofoblasto está alterada, lo que ocasiona que las arterias espirales uterinas no sean alcanzadas por el trofoblasto invasor y en consecuencia no experimenten los cambios que las convierten en arterias con capacidad de flujo sanguíneo alto, con lo cual se compromete el suministro sanguíneo al feto en crecimiento. De este modo, la preeclampsia es un modelo biológico en el que la función de invasión del trofoblasto se encuentra dañada y en el que de manera potencial se podrían ver involucrados los retinoides.

El estudio de la modulación de la diferenciación del trofoblasto humano se ha visto obstaculizada por la imposibilidad de estudiar tejidos humanos de las etapas tempranas del desarrollo normal. Por esta razón, se ha propuesto el uso de diferentes modelos experimentales, tales como el cultivo *in vitro* de vellosidades coriónicas humanas, que permite duplicar dos importantes eventos secuenciales del desarrollo de la placenta. Se ha demostrado que los explantes de placenta en cultivo muestran crecimiento *in vitro*, duplicando el fenómeno de invasión de la matriz extracelular y que este fenómeno se asocia a cambios en la diferenciación del trofoblasto, con modulación de la transformación del citotrofoblasto a sinciotrofoblasto.

Aunque no lo sabemos de manera directa, lo anterior podría ser similar a lo que sucede en la situación *in vivo*, durante la implantación, dado lo que sabemos de otros modelos animales de este fenómeno. La conducta invasiva del trofoblasto se manifiesta cuando las células del citotrofoblasto migran fuera de las vellosidades coriónicas y forman columnas de células (trofoblasto columnar), a partir de las cuales invaden la superficie del cultivo.¹¹ También se ha demostrado que este proceso de diferenciación hacia un fenotipo invasor es dependiente de la expresión de marcadores moleculares como las metaloproteasas de matriz extracelular 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) y

que son utilizadas como las herramientas moleculares del citotrofoblasto para el proceso de invasión, que depende de la degradación de la matriz extracelular circundante. Al terminar el proceso de invasión, las células de citotrofoblasto se transforman progresivamente en sinciotrofoblasto, producen gonadotropina coriónica humana (hCG)¹¹ e inician sus funciones de intercambio con el ambiente materno, apagando la expresión de las enzimas líticas mencionadas anteriormente.

Por lo anterior, y dado que no contamos con otros modelos para su estudio, el cultivo de vellosidades coriónicas humanas representa un modelo *in vitro* para el estudio de factores que pudieran estar implicados en la modulación de la implantación y desarrollo placentario durante el embarazo, como sería el caso de los retinoides.

El objetivo de este estudio es conocer el efecto de diferentes retinoides (retinol, ácido 9-cis retinoico, ácido *all-trans* retinoico) sobre la secreción de MMP-2 y MMP-9, que se utilizan como marcadores del proceso de adquisición de fenotipo invasor del citotrofoblasto presente en vellosidades coriónicas humanas y el efecto sobre la diferenciación de células de citotrofoblasto aisladas, en un modelo *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de vellosidades coriónicas

Se utilizaron placentas de mujeres programadas para la resolución del embarazo por cesárea, con los siguientes criterios de inclusión: entre 18 y 35 años, embarazo sin patología, con edad gestacional entre 38 y 40 semanas, con producto único. La placenta se lavó cinco veces con 500 mL de solución salina fría amortiguada con fosfatos (PBS; Sigma, USA). Bajo condiciones de esterilidad se eliminaron las membranas corioamnióticas, el tejido decidual y vasos sanguíneos. Se obtuvieron fragmentos pequeños (3 a 5 mm) de vellosidades coriónicas de aproximadamente 0.5 g de peso húmedo, que fueron separados manualmente de las placentas bajo observación al microscopio. Las vellosidades

se cultivaron en cajas de cultivo de seis pozos (Falcon, USA) en 1 mL de medio Eagle de Dulbecco (Gibco BRL Bethesda, USA), suplementado con 1 mM de hidrolizado de lactoalbúmina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 10 µg/mL de anfotericina y 1 mM de piruvato de sodio (Gibco BRL, Bethesda, USA), durante uno a cuatro días a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. El medio de cultivo se sustituyó cada 24 horas por medio fresco.

Ensayos de viabilidad (XTT)

La viabilidad de las vellosidades coriónicas se evaluó mediante un ensayo colorimétrico que tiene como fundamento la transformación de sales de tetrazolio (XTT, *Boehringer, Mannheim Germany*), de color amarillo a sales de formazan de color naranja, por las células con metabolismo activo.¹³

Estimulación a vellosidades coriónicas con retinoides

Se estimularon las vellosidades coriónicas con concentraciones fisiológicas diferenciales de retinoides (*Sigma, USA*). Para el Retinol se utilizó 2.5 a 40 µM; para el ácido 9-cis retinoico y el ácido *all-trans* retinoico se utilizaron 0.25 a 4.0 µM. En todos los experimentos se incluyeron explantes que no fueron estimulados con los retinoides. El retinoide disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO, *Sigma, USA*), se agregó directamente al medio de cultivo y al cabo de un día se retiró una alícuota del medio condicionado y se agregó un volumen proporcional que contenía la misma concentración del retinoide. La estimulación se mantuvo por cuatro días para todas las concentraciones utilizadas. Los medios condicionados se capturaron cada 24 horas.

Zimografía en gelatina

Se cuantificó la actividad gelatinolítica del medio condicionado por los retinoides. Se aplicó un volumen equivalente a 10 µg de proteína de los medios condicionados a un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (*Amresco, USA*) al 8% copolimerizado con



gelatina porcina (Sigma, USA).¹⁴ La actividad gelatinolítica debida a MMP-2 y MMP-9 observada en los zimogramas se cuantificó por densitometría en un analizador de imágenes con el empleo del *software* NIH-Image V1.6 (NIH, Bethesda, USA). La concentración de proteína en los medios condicionados se cuantificó con el método de Bradford,¹⁵ empleando como referencia una curva estándar de albúmina sérica de bovino (Sigma, USA).

Cultivo celular

Como complemento al cultivo de explantes, se aislaron y purificaron células de citotrofoblasto de las mismas placentas de donde se obtuvieron los explantes. Se utilizó la técnica de Kliman,¹⁶ que emplea DNAsa (Sigma, USA) y tripsina (Difco, France) para separar las células de placenta y purificación del citotrofoblasto con un gradiente de Percoll (Pharmacia, Suiza). Las células de citotrofoblasto fueron sembradas por triplicado en placas de cultivo de seis pozos a una densidad 1×10^6 células/pozo a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂. El cultivo se desarrolló por un periodo de cuatro días, tiempo en el cual el citotrofoblasto se diferencia a sinciciotrofoblasto.

Estimulación celular

Con el fin de identificar el efecto de la vitamina A y sus metabolitos en la diferenciación del citotrofoblasto a sinciciotrofoblasto, se agregaron al cultivo primario los mismos retinoides utilizados en los explantes de placenta y con las mismas condiciones. Las células en cultivo fueron observadas por microscopía óptica y se documentaron los cambios en la diferenciación inducidos por los retinoides a lo largo uno a cuatro días de cultivo.

Análisis estadístico

La comparación de los diferentes grupos se realizó mediante un análisis tipo Mann-Whitney, en la que una $p \leq 0.05$ fue considerada como significativa. Todos los experimentos se realizaron tres veces con muestras por triplicado.

RESULTADOS

Ensayos de viabilidad con XTT

Las células de las vellosidades coriónicas estuvieron metabólicamente activas (demostrado por la reducción de XTT) durante once días de cultivo (Figura 1). Durante el periodo experimental empleado en este estudio (cuatro días), la reducción de XTT se incrementó de manera proporcional con el tiempo de cultivo (Figura 1). La reducción de XTT permaneció sin cambio del día 7 al 9 y se incrementó de manera proporcional con el tiempo de cultivo hasta el día 11 del mismo.

Efecto de retinoides sobre la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9

Se observó una respuesta clara de estimulación en la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas 2 y 9 por efecto de todas las

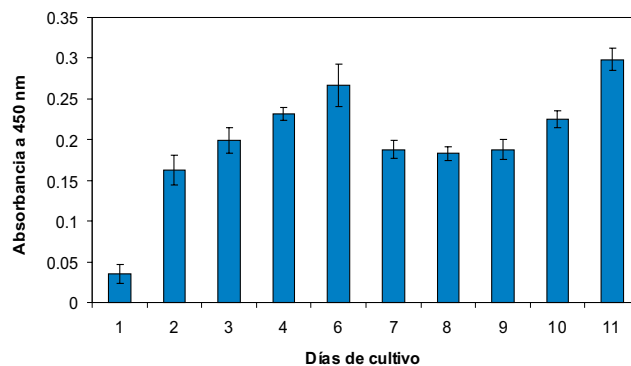


Figura 1
Viabilidad de las vellosidades coriónicas. Las células de las vellosidades cultivadas se mantuvieron viables durante once días y su actividad metabólica (demostrada por la reducción de XTT) se incrementó proporcionalmente con el tiempo de cultivo durante los días del 1 al 6 y del 9 al 11. Cada barra muestra el valor promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes con muestras por triplicado ($n = 3 \pm DE$).

concentraciones de retinol, al cuarto día de estimulación del cultivo (Figura 2). La misma respuesta se pudo documentar con las diferentes concentraciones de ácido 9-cis retinoico, aunque la respuesta fue obtenida a concentraciones menores que las necesarias para la estimulación con retinol y el efecto se observó mejor al segundo día de estimulación del cultivo (Figura 3). En cambio, no se pudo estimular la actividad de MMP-2 y MMP-9 al estimular los explantes con ácido *all-trans* retinoico, en ningún momento del cultivo, ni con las dosis más altas (datos no mostrados).

Efecto de retinoides sobre la diferenciación del citotrofoblasto aislado

Después de ensayar diferentes concentraciones de los retinoides en los cultivos con

vellosidades coriónicas; las células de citotrofoblasto en cultivo, fueron estimuladas con retinol 20 µM, ácido 9 cis retinoico 2.0 µM, y ácido *all-trans* retinoico 2.0 µM, para documentar los cambios de morfología hacia sinciciotrofoblasto. El sinciciotrofoblasto se formó de manera espontánea en los cultivos no estimulados con retinoides, al cabo de cuatro días de cultivo (Figura 4). En presencia de retinol o ácido 9-cis retinoico, la formación de los sincicios se inició desde el día 2 de cultivo (datos no mostrados) y al tercer día todas las células se habían fusionado (Figuras 5a y 5b) de manera similar a como sucedió en los cultivos control (Figuras 4d y 5d). En el caso de las células estimuladas con ácido *all-trans* retinoico, la fusión ocurrió hasta el cuarto día de cultivo (Figura 5c), momento en el

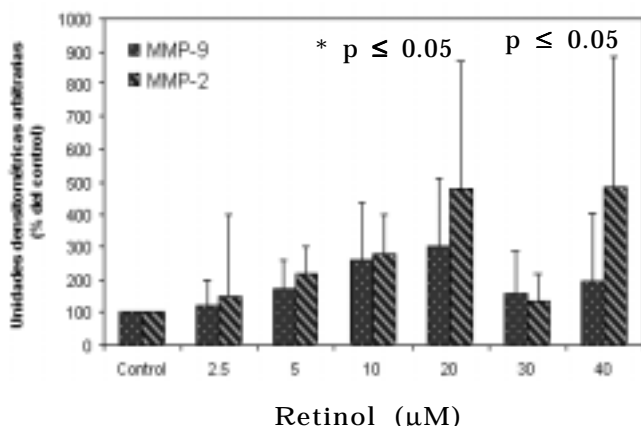


Figura 2

Efecto de retinol sobre la actividad de metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, al cuarto día de cultivo.

La estimulación a vellosidades coriónicas con retinol induce un incremento dosis dependiente en la actividad gelatinolítica de las enzimas MMP-2 y MMP-9 producidas durante el cultivo. Cada barra muestra el valor promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes con muestras por triplicado (n = 3 ± DE).

Mann-Whitney; p ≤ 0.05.

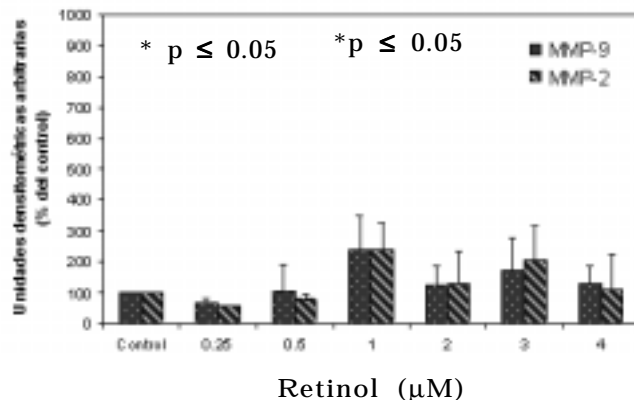


Figura 3

Efecto de ácido 9 cis retinoico sobre la actividad de metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, al segundo día de cultivo.

La estimulación a explantes con concentraciones crecientes de ácido 9 cis retinoico induce un incremento en la actividad gelatinolítica de las enzimas MMP-2 y MMP-9 producidas durante el cultivo. Cada barra muestra el valor promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes con muestras por triplicado (n = 3 ± DE).

Mann-Whitney; p ≤ 0.05.



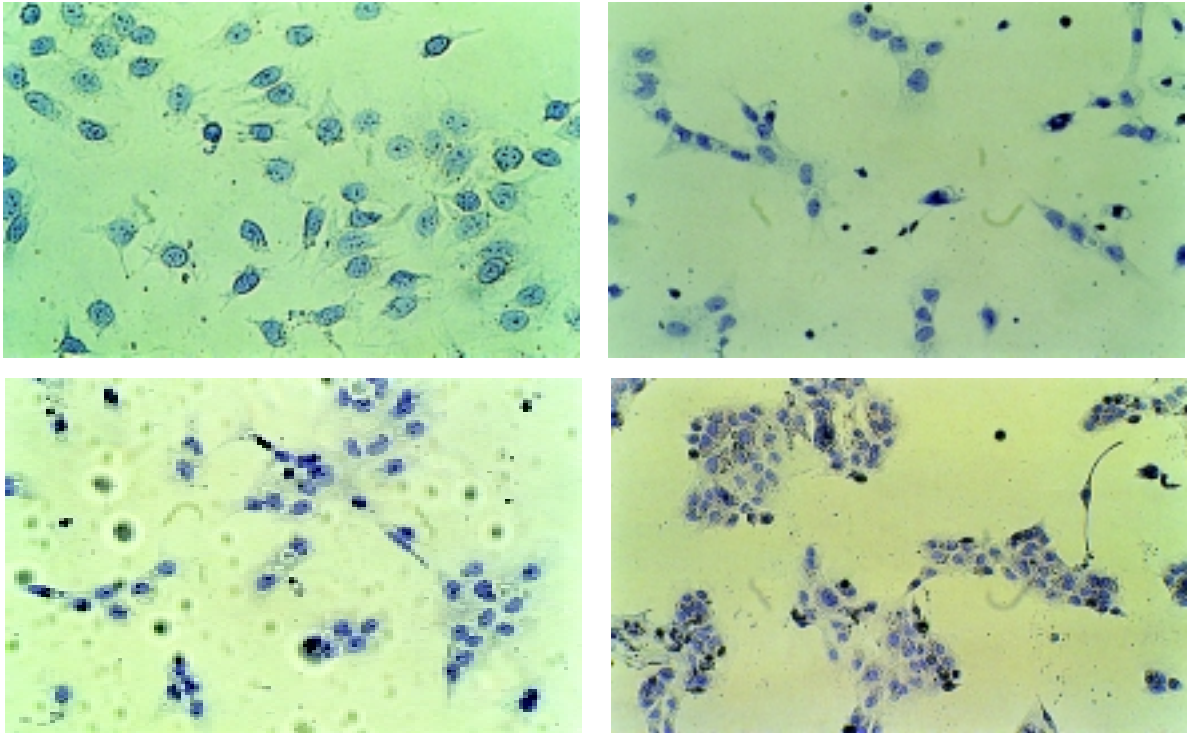


Figura 4

Diferenciación *in vitro* de células de citotrofoblasto aisladas de placenta humana de gestación a término. Las células de trofoblasto purificado fueron cultivadas a una densidad de 1.0×10^6 células/pozo durante cuatro días, fijadas en acetona/metanol (1:1) y teñidas con hematoxilina de Harris.

a) Día 1, crecimiento en extensión e interacción del citotrofoblasto con células vecinas. Las flechas, señalan zonas de interacción entre las células de citotrofoblasto y crecimiento en extensión de las mismas.

b) Día 2, formación de agregados de dos, tres o más células de citotrofoblasto.

c) Día 3, formación de estructuras similares a sinciotrofoblasto con núcleos dispersos contenidos en un citoplasma aparente.

d) Día 4, sinciotrofoblasto con números variables de núcleos.

que se observó un número y tamaño de sinciotrofoblastos reducidos.

DISCUSIÓN

Los modelos de cultivo *in vitro* de vellosidades coriónicas y de células de citotrofoblasto aisladas, son las únicas metodologías disponibles y de potencialidad utilizable para entender el efecto de diferentes compuestos contenidos en el microambiente en el que se desarrollan los procesos iniciales del desarrollo embrionario humano. De esta manera, hemos utilizado estos modelos para iniciar la caracterización

del efecto de diferentes retinoides en los eventos de invasión y diferenciación del trofoblasto.

A pesar de que éstos son modelos experimentales son utilizados por varios grupos en distintas partes del mundo, se realizó la validación de la viabilidad de las vellosidades coriónicas bajo las condiciones de cultivo utilizadas. Las vellosidades mantienen su metabolismo activo hasta por 11 días de cultivo y el incremento en la reducción de XTT, observado en los primeros días, confirma la proliferación de las células del citotrofoblasto, lo que coincide con su diferenciación a

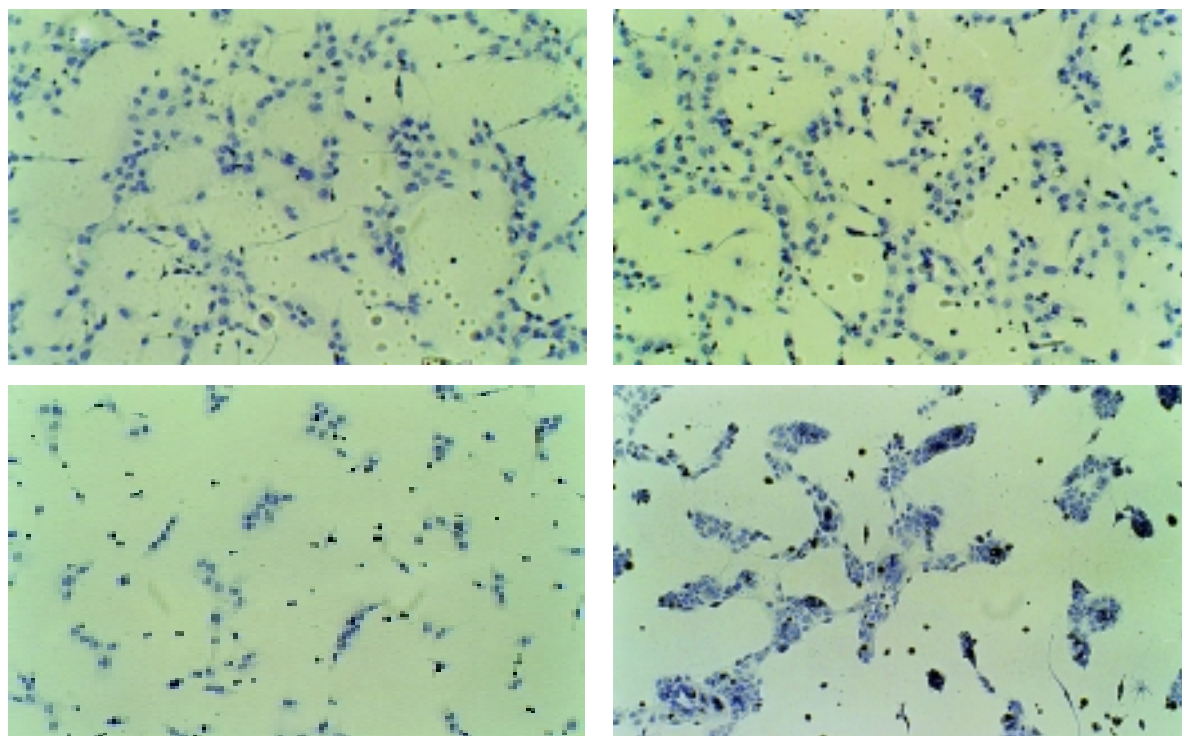


Figura 5

Efecto de los retinoides sobre la diferenciación del citotrofoblasto. Las células de trofoblasto purificado fueron cultivadas a una densidad de 2.5×10^6 células/pozo de uno a cuatro días, fijadas en acetona/metanol (1:1) y teñidas con hematoxilina de Harris. a) y b) En presencia de retinol y ácido 9 cis retinoico se observó formación de sinciotrofoblasto, desde el día tres de cultivo. c) En presencia de ácido all-trans retinoico la formación de sinciotrofoblasto se observó hasta el día 4 del cultivo. d) Control al día cuatro, células de citotrofoblasto cultivadas en ausencia de retinoides.

sinciotrofoblasto, tal y como ha sido reportado en forma previa.¹² También se ha demostrado que el crecimiento del tejido es dependiente de la producción del factor de crecimiento similar a insulina tipo I y en menor grado del tipo II y activina, que son producidos por el mesenquima vellosa.¹⁷ Los tiempos posteriores de cultivo mostraron disminución progresiva de la viabilidad del tejido, razón por la que se limitó el tiempo de cultivo dentro de los primeros días del cultivo.

Se ha demostrado que el efecto de los retinoides sobre la diferenciación del trofoblasto está mediado, en parte, a través de la inducción de hormonas como la hCG y leptina, que son marcadores de la diferenciación del

trofoblasto a sinciotrofoblasto (ya que en presencia del retinol y el ácido 9-cis retinoico, la producción de tales hormonas se incrementa y esto favorece la formación del sinciotrofoblasto).

En nuestro estudio, la estimulación con retinol, que es el retinoide precursor sin actividad biológica, resultó en el incremento en la actividad de MMP-2 y MMP-9. Con ello se demuestra que tanto las vellosidades coriónicas, como las células de citotrofoblasto aisladas, poseen la maquinaria enzimática necesaria para transformar el retinol en sus metabolitos, tales como el ácido 9-cis retinoico y el ácido *all-trans retinoico* y transducir las señales intracelulares correspondientes que



permitieron observar el efecto fisiológico esperado. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado la expresión en células de trofoblasto de enzimas implicadas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y proteína de unión al retinol celular) en la transformación del retinol y generación de sus metabolitos con actividad biológica, tal como el ácido retinoico.²⁰ Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de transporte de retinol que permite su ingreso al citotrofoblasto y su posterior unión al receptor intracelular, que es el responsable de transducir la señal al actuar como factor de transcripción y regular la iniciación de la transcripción en las regiones promotoras que contienen las secuencias conocidas con el nombre de RAREs.²¹ Al ser ocupadas estas regiones del DNA, se dará por consecuencia la expresión observada de la MMP-2 y MMP-9, aunque en estos ensayos no documentamos de manera directa la expresión de éstos genes. El efecto de estimulación con retinol fue aparente desde el primer día de incubación, pero se observó mejor al cuarto día de cultivo. En tanto que, al agregar el ácido 9-cis retinoico, la respuesta óptima se logró al segundo día de cultivo. Todo esto permite suponer que el efecto final de inducción del incremento de la actividad de MMP-2 y MMP-9 es mediado por el ácido 9-cis retinoico, que aparece como metabolito intracelular partiendo de retinol. En este mismo sentido, el metabolito *all-trans* carece

de efecto sobre esta ruta de transducción, en concordancia con el modelo propuesto por Pan y Brinckerhoff.²² Estas autoras proponen que las proteínas fos y jun no se unen a la zona promotora AP-1 debido a que los retinoides interactúan con ellas y se produce la inactivación de la transcripción y traducción de los genes de metaloproteasas que tienen estas zonas promotoras. Por lo tanto, se sustenta que el tejido placentario se comporta de acuerdo al modelo de translocación del retinol clásico y no se ajustó al modelo de represión de la expresión de metaloproteasas mediado por fos y jun²³ que ha sido involucrado en la inducción de otras metaloproteasas.

Uno de los objetivos más importantes en este estudio fue validar un método que nos permitiera reproducir el modelo de formación de sinciciotrofoblasto *in vitro*. Los cambios en la diferenciación inducidos por los retinoides retinol y 9-cis fueron documentados por cambios morfológicos de las células en cultivo y confirmaron los hallazgos de inducción de marcadores de diferenciación y que fueron documentados en la placenta entera. No fue posible realizar la medición de la diferenciación de citotrofoblasto a sinciciotrofoblasto a través de la MMP-2 y MMP-9, ya que la forma en que se llevó a cabo estos experimentos no lo permitieron. El hecho de poder documentar un efecto génico en el trofoblasto humano, abre la posibilidad de explorar con mayor detenimiento los mecanismos de acción de los retinoides.

ABSTRACT

Objective: In the current study we investigate the effect of different retinoids on the function and cellular differentiation of human cytotrophoblast (CTB) cells in culture.

Material and Methods: Experimental *in vitro* study that analyzed explants of placenta from term pregnancy were cultured and stimulated with different physiological concentrations of retinol (ROL), 9-cis retinoic acid (CRET) and all-trans retinoic acid (TRET). The optimal conditions of CTB culture and changes in metalloproteinase-9 (MMP9) and metalloproteinase-2 (MMP2) secretion stimulated by retinoids were analyzed by zymography. Isolated CTB cells were stimulated with retinoids and morphological changes of *in vitro* syncytio formation were observed by light microscopy.

Results: The explants of placenta had a dose-dependent increment in the activity of MMP-2 and MMP-9 when they were incubated in presence of ROL and in less proportion when they were incubated with CRET and TRET. For isolated CTB cells, CRET stimulates the differentiation to syncytio within 48 h of incubation, whereas in the absence of TRET differentiation started after the fourth day incubation.

Conclusions: The placenta and isolated CTB cells have the capacity to respond to ROL, this fact suggest the presence of a metabolic pathway necessary to transform retinol to the biological active retinoids like CRET and TRET. The effect of these retinoids might be expressed in the function of implantation and developing placenta.

KEY WORDS: *Explants of placenta, retinoids, cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, metalloproteinase 9, metalloproteinase 2.*

REFERENCIAS

1. Quadro L, Gamble M, Vogel S. Retinol and retinol binding protein: gut integrity and circulating immunoglobulins. *J Infect Disease* 2000; 182: 97.
2. Torres y Torres N. Avances en vitamina A y proteínas que unen retinoides. *Rev Invest Clin* 1995; 47: 149-60.
3. Woessner F, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPS. *EUA: Oxford University Press*; 2000, p. 1-41.
4. Graham CH, Lala PK. Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol* 1992; 70: 867-74.
5. McMaster M, Bass K. Human trophoblast invasion. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734: 122-31.
6. Aplin JD. The cell biology of human implantation. *Placenta* 1996; 17: 269-75.
7. Guibourdenche J. Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR alfa in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1384-7.
8. Stephanou A, Sarlis HJ, Richards R, Handwerker S. Expression of retinoic acid receptor subtypes and cellular retinoic acid binding protein-II m RNAs during differentiation of human trophoblasts cells. *Biophys Res Commun* 1994; 202: 772-80.
9. Guibourdenche J, Tarrade A, Laurendeau I, Rochette-Egly C, Chambon P, Vidaud M, et al. Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblast. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2550-5.
10. Fisher GJ, Talwar HS. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathway in human skin *in vivo*. *J Clin Invest* 1998; 101: 1432-40.
11. Aplin JD, Haigh T, Jones CJP, Church HJ, Vicóvac L. Development of cytotropho-



- blast columns from explanted first-trimester human placental villi: role of fibronectin and integrin $\alpha 5\beta 1$. *Biol Rep* 1999; 60: 828-38.
12. Simán CM, Sibley CP, Jones CJP, Turner MA, Greenwood SL. 2001. The functional regeneration of syncytiotrophoblast in cultured explants of term placenta. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2001; 280: R1116-R22.
 13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-4.
 14. Vadillo-Ortega F, González G, Furth E, Lei H, Muschel R, Stetler W, Strauss J. 92 kDa Type-IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995; 146: 148-56.
 15. Bradford MA. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann Biochem* 1976; 72: 248-54.
 16. Kliman HJ, Nestle JE, Sermasi E, Sanger JE, Strauss JF. Purification, characterization and "in vitro" differentiation of cytotrophoblasts from human term placenta. *Endocrinol* 1986; 118: 1567-82.
 17. Guibourdenche J. Retinoid receptors expression in human term placenta: involvement of RXR α in retinoid induced-hCG secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 83: 1384-7.
 18. Stephanou A, Sarlis HJ, Richards R, Handwerger S. Expression of retinoic acid receptor subtypes and cellular retinoic acid binding protein-II mRNAs during differentiation of human trophoblasts cells. *Biophys Res Commun* 1994; 202: 772-80.
 19. Guibourdenche J, Tarrade A, Laurendeau I, Rochette-Egly C, Chambon P, Vidaud M, et al. Retinoids Stimulate Leptin Synthesis and Secretion in Human Syncytiotrophoblast. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2550-5.
 20. Blanchon L, Sauvart P, Bavik C, Gallot D, Charbonne F, Gouabau MC, et al. Human choriocarcinoma cell line JEG-3 produces and secretes active retinoids from retinol. *Hum Mol Rep* 2002; 8: 485-93.
 21. Breitmann TR, Collins SJ, Keene BR. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* 1981; 6: 1000.
 22. Pan L, Brinckerhoff CE. Inhibition of collagenase gene expression in synovial fibroblasts by all-trans and 9-cis retinoic acid. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732: 335-47.
 23. Connolly TJ, Clohisy JC, Shilt JS. Retinoic acid stimulates interstitial collagenase messenger ribonucleic acid in osteosarcoma cells. *Endocrinol* 2001; 135: 2542-8.