

Modelo de cultivo de explantes placentarios humanos optimizado y estandarizado como herramienta para investigación biomédica

Optimized and standardized human Placental explant culture model as a tool for biomedical research

Goncalves, Juvic; Casart, Ysabel; Camejo, María

 Juvic Goncalves

juvicm@gmail.com

Profesora Agregada. Directora de la Escuela de Bioanálisis "Dr. Rafael Rangel". Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela

 Ysabel Casart

casarty@gmail.com

Profesora Titular. Escuela de Nutrición y Dietética. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

 María Camejo

Profesora Titular. Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar. (Póstuma)

Revista Digital de Postgrado
Universidad Central de Venezuela, Venezuela
ISSN-e: 2244-761X
Periodicidad: Cuatrimestral
vol. 15, núm. 2, e457, 2026
revistadpgmeducv@gmail.com

Recepción: 04 de mayo de 2026
Aprobación: 13 de julio de 2026

DOI: <https://doi.org/10.37910/RDP.2026.15.2.e457>

Cómo citar: Goncalves J, Casart YC, Camejo MI. Modelo de cultivo de explantes placentarios humanos optimizado y estandarizado como herramienta para investigación biomédica. Rev. Digit Postgrado 2026; 15(2): e457.doi.10.37910/RDP.2026. 15.2. e457

Autor de correspondencia: juvicm@gmail.com

Resumen: Introducción: La placenta humana es un órgano altamente especializado, esencial para el desarrollo fetal por sus funciones endocrinas, metabólicas e inmunológicas. Su estudio en modelos animales presenta limitaciones debido a diferencias estructurales y funcionales entre especies. Los cultivos de explantes placentarios humanos representan una herramienta experimental valiosa, ya que preservan la arquitectura tisular y las interacciones celulares, permitiendo estudiar mecanismos fisiológicos, fisiopatológicos y farmacológicos bajo condiciones controladas. Objetivo: Desarrollar, optimizar y caracterizar un modelo de cultivo de explantes placentarios humanos del tercer trimestre mediante la evaluación integrada de la viabilidad, diferenciación e integridad morfológica e inmunológica. Métodos: Se recolectaron cinco placentas de mujeres nulíparas sanas, obtenidas por cesárea o parto vaginal. Los explantes fueron cultivados durante 7 días en medio RPMI-1640 suplementado a 37 °C, 5% CO₂ y 10% O₂. La viabilidad se evaluó mediante la actividad del lactato deshidrogenasa (LDH), la diferenciación mediante la secreción de la fracción beta de gonadotropina coriónica humana (β -hCG) y la integridad tisular mediante inmunohistoquímica para: β -hCG, lactógeno placentario humano (hPL), fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), CD45⁺, CD68⁺ y CD3⁻. Resultados: La actividad de LDH mostró un aumento al día 2, disminución hasta el día 5, incrementando al día 7. La β -hCG alcanzó su máximo al día 4, sugiriendo diferenciación trofoblástica activa. La inmunohistoquímica confirmó la expresión de β -hCG, hPL y PLAP, con mayor intensidad para hPL y mayor presencia de CD45⁺ y CD68⁺ en el estroma vellositario. Conclusiones: El modelo demuestra viabilidad reproducible y estabilidad funcional durante 7 días. Constituye una plataforma útil para estudios de inflamación, estrés oxidativo, hipoxia y evaluación farmacológica en tejido placentario humano.

Palabras claves: Explantes Placentarios, Viabilidad Celular, Sinciciotrofoblasto, Estudio de Validación Metodológica, Lactato Deshidrogenasa.

Abstract: Introduction: The human placenta is a highly specialized organ essential for fetal development due to its endocrine, metabolic, and immunological functions. Studies using animal models present limitations due to structural and functional differences between species. Human placental explant cultures represent a valuable experimental tool because they preserve tissue architecture and cell-cell interactions, allowing the study of physiological, pathophysiological, and pharmacological mechanisms under controlled conditions. Objective: To develop, optimize, and characterize a third-trimester human placental explant culture model through integrated assessment of viability, trophoblast differentiation, and morphological and immunological integrity. Methods: Five placentas from healthy nulliparous women were collected following cesarean section or vaginal delivery. Explants were cultured for 7 days in supplemented RPMI-1640 medium at 37 °C under 5% CO₂ and 10% O₂. Viability was evaluated by lactate dehydrogenase (LDH) activity, differentiation by β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) secretion, and tissue integrity by immunohistochemistry for β -hCG, human placental lactogen (hPL), placental alkaline phosphatase (PLAP), CD45⁺, CD68⁺ and CD3⁻. Results: LDH activity increased on day 2, decreased until day 5, and increased again by day 7. β -hCG secretion peaked on day 4, suggesting active trophoblast differentiation. Immunohistochemistry confirmed the expression of β -hCG, hPL, and PLAP, with stronger staining for hPL and a higher presence of CD45⁺ and CD68⁺ cells within the villous stroma. Conclusions: This model demonstrates reproducible viability and functional stability for 7 days. It provides a useful platform for studies of inflammation, oxidative stress, hypoxia, and pharmacological evaluation in human placental tissue.

Keywords: Placental Explants, Cell Viability, Syncytiotrophoblast, Methodological Validation Study, Lactate Dehydrogenase.

INTRODUCCIÓN

La placenta humana es un órgano transitorio indispensable para el desarrollo y supervivencia fetal, que cumple funciones de intercambio bidireccional de nutrientes, gases y productos de desecho entre la

circulación materna y fetal ⁽¹⁻²⁾. Desde el punto de vista endocrino, la placenta sintetiza y secreta gonadotropina coriónica humana (hCG), lactógeno placentario humano (hPL), progesterona, estrógenos y una amplia variedad de péptidos con funciones reguladoras del embarazo ⁽¹⁻³⁾. Su compleja arquitectura está organizada en vellosidades coriónicas dispuestas en cotiledones que contienen capilares fetales, células inmunológicas y estroma conectivo, los cuales conforman la unidad funcional del interfaz materno fetal ⁽¹⁻²⁾. Desde el punto de vista inmunológico, la placenta constituye un microambiente tolerogénico especializado que modula la respuesta inmune materna para garantizar la aceptación del semialoinjerto fetal. En este contexto, participan activamente células NK uterinas (uNK), macrófagos deciduales (células de Hofbauer), células T reguladoras (Treg) y linfocitos T, los cuales, a través de una red de señalización mediada por citocinas pro y antiinflamatorias, mantienen el balance Th1/Th2 necesario para el éxito gestacional ⁽⁴⁻⁵⁾.

Dado que la placenta humana difiere morfológica y funcionalmente de la de otras especies, los modelos animales presentan limitaciones significativas para reproducir su fisiología ⁽⁶⁾. Por ello, los cultivos de explantes placentarios se han consolidado como un modelo experimental de elección para el estudio del interfaz materno fetal en condiciones controladas, ya que conservan la arquitectura tridimensional de las vellosidades, la viabilidad celular y la funcionalidad endocrina e inmunológica ⁽⁷⁻⁹⁾. Estos cultivos permiten explorar mecanismos fisiopatológicos relevantes, como los asociados a la preeclampsia, así como evaluar el efecto de intervenciones terapéuticas bajo condiciones de hipoxia o de estrés inflamatorio inducido ⁽¹¹⁾. Entre dichas intervenciones destaca el sulfato de magnesio (MgSO₄), ampliamente utilizado en obstetricia para la neuroprotección fetal y el manejo de la preeclampsia severa, cuyo efecto modulador sobre la producción de citocinas y el estrés oxidativo placentario ha sido documentado en modelos experimentales, aunque los mecanismos celulares implicados requieren mayor investigación ⁽¹²⁾.

Sin embargo, la literatura científica evidencia una brecha metodológica relevante que aún no ha sido resuelta de manera integral: la ausencia de protocolos de cultivo estandarizados y reproducibles entre laboratorios y la falta de validación simultánea de los parámetros funcionales, morfológicos e inmunológicos que permitan certificar la competencia del modelo experimental ⁽⁷⁻⁸⁾. La mayoría de los estudios publicados valida únicamente uno o dos parámetros de viabilidad (generalmente LDH o β -hCG), sin integrar la evaluación morfológica e inmunológica como parte del protocolo de validación, lo que limita la confiabilidad y comparabilidad de los resultados entre diferentes centros de investigación. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar, optimizar y caracterizar un modelo de cultivo de explantes de placenta humana de tercer trimestre mediante la evaluación integrada de la viabilidad celular, la diferenciación funcional del trofoblasto y la integridad morfológica e inmunológica del tejido, con el fin de establecer una plataforma reproducible y validada para estudios biomédicos en tejido placentario humano, incluyendo estudios de modulación farmacológica, inflamación, hipoxia y estrés oxidativo.

MÉTODOS

Población de estudio: Se seleccionaron cinco (5) mujeres nulíparas, de origen urbano similar, con edad media de 21 años (rango: 18-32 años) y edad gestacional media de 37 ± 2 semanas, que asistieron a la Sala de Partos del Hospital Universitario de Caracas. Este tamaño muestral es concordante con estudios de validación metodológica de explantes placentarios humanos reportados en la literatura, donde la disponibilidad limitada de tejido y la necesidad de controlar la variabilidad biológica intrínseca justifican el uso de muestras reducidas ⁽⁷⁻⁸⁾. Con el fin de controlar posibles factores de confusión, se registró el tipo de parto (cesárea o vaginal), el tiempo transcurrido entre el parto y el inicio del procesamiento placentario (≤ 30 minutos en todos los casos) y la paridad. Los criterios de exclusión comprendieron la presencia de enfermedades asociadas al embarazo (diabetes gestacional, hipertensión, preeclampsia o infecciones virales congénitas) y los partos inducidos. Se recabó información mediante ficha clínica y consentimiento informado escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Simón Bolívar y del Hospital Universitario de Caracas. La letra η indica el número de placentas incluidas en cada fase experimental ($\eta = 5$).

Obtención y preparación de los explantes: Las placentas se recolectaron por cesárea o parto natural y se transportaron en frío al laboratorio para su procesamiento inmediato. Una vez analizada la morfología placentaria, siguiendo un mapa placentario previamente elaborado para cada muestra con el fin de garantizar la representatividad y reproducibilidad, se seleccionaron uno o dos cotiledones centrales de la placa central por placenta de la porción del corión, excluyendo aquellos con signos de isquemia, placas de grasa o necrosis tisular. Los cotiledones fueron separados del resto del tejido placentario, se removió la membrana placentaria y la decidua mediante lavados simultáneos con solución de PBS-D estéril, con el fin de eliminar eritrocitos, restos deciduales y materiales contaminantes. Posteriormente, los cotiledones se fragmentaron en explantes de aproximadamente 1 mm³ y 1,5 – 3,0 mg de peso húmedo, los cuales se lavaron tres veces con PBS-D estéril antes de iniciar los cultivos. De cada placenta se obtuvieron entre 20 y 30 explantes, de los cuales se seleccionaron aquellos con morfología vellositaria conservada para su inclusión en el protocolo de cultivo.

Condición de cultivo de los explantes: Cada explante fue cultivado individualmente en 1,5 mL de medio RPMI-1640, suplementado con: suero fetal bovino inactivado al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, acetato de retinol 0,1 µg/mL, insulina 1 µg/mL, hidrocortisona 0,1 µg/mL, anfotericina B al 1%, L-glutamina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato de sodio al 1% y gentamicina al 0,1%. Los explantes se cultivaron en placas NUNC™, con un explante por pozo, durante 7 días a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% CO₂, 10% O₂ y balance de N₂. Durante las primeras 24 horas se realizó la estabilización de los cultivos, tras la cual se renovó el medio y se mantuvieron en las condiciones descritas. El medio se renovó diariamente; los pozos que presentaron signos de contaminación fueron excluidos del estudio ⁽¹³⁻¹⁵⁾. Los sobrenadantes de los medios de cultivo fueron recolectados diariamente, centrifugados a 3.500 rpm durante 15 minutos para eliminar restos celulares y almacenados a -20 °C hasta su análisis. La evaluación de la viabilidad y diferenciación se realizó mediante la determinación de la actividad del Lactato Deshidrogenasa (LDH) y la concentración de gonadotrofina coriónica humana fracción beta (β-hCG), respectivamente.

Viabilidad celular: La viabilidad celular se evaluó mediante la determinación de la actividad enzimática del Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes del medio de cultivo (Sigma-Aldrich, DG1340-K). Dado que la LDH es una enzima citosólica liberada al medio extracelular cuando se pierde la integridad de la membrana plasmática, su actividad en el sobrenadante refleja indirectamente el grado de daño y muerte celular ⁽¹⁵⁾. Los resultados se reportaron en unidades internacionales por litro (UI/L) según las especificaciones del kit.

Diferenciación celular: La diferenciación del sinciotrofoblasto se evaluó mediante la cuantificación de la gonadotrofina coriónica humana fracción beta (β-hCG) en los sobrenadantes del medio de cultivo. La β-hCG es sintetizada y secretada de forma específica por el sinciotrofoblasto, por lo que su determinación constituye un marcador de diferenciación funcional del trofoblasto ampliamente aceptado en la literatura ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾. La concentración de β-hCG fue determinada mediante ensayo inmunométrico de quimioluminiscencia en fase sólida (Equipo Siemens Immulite 1000) y los resultados se reportaron en mUI/mL normalizados por concentración de proteína total (mUI/mg de proteína), determinada mediante el ensayo colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce BCA Protein Assay Kit, N° 23225, Thermo Scientific).

Inmunohistoquímica: Se procesaron explantes frescos (condición basal, día 0) y explantes cultivados durante 7 días (postcultivo) mediante fijación en formalina al 10%, deshidratación progresiva en etanol, aclaramiento con xilol y embebido en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 4–5 µm, montados sobre portaobjetos con poli-L-lisina. La recuperación antigénica se realizó con Target Retrieval Solution (Dako) y el bloqueo de peroxidasas endógenas con H₂O₂ al 3%. Se utilizaron anticuerpos primarios para los siguientes antígenos: β-hCG, Lactógeno Placentario humano (hPL), Fosfatasa Alcalina Placentaria (PLAP), antígeno leucocitario común (CD45⁺), macrófagos (CD68⁺) y células CD3⁺ (fenotipo compatible con células NK deciduales: CD56^{bright}/CD16⁺/CD3⁺) ⁽²¹⁾, con controles positivos y negativos apropiados ⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. La evaluación de los marcadores inmunológicos se realizó mediante análisis semicuantitativo: 0 = ausencia; 1 = pocas células positivas; 2 = moderado número de células positivas; 3 = numerosas células positivas.

Análisis estadístico: Dado el tamaño reducido de la muestra ($\eta = 5$) y la distribución no normal de los datos (evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk), las comparaciones se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparaciones planificadas entre pares de días de cultivo consecutivos (día 2 vs. día 3, día 3 vs. día 4, día 4 vs. día 5, día 5 vs. día 6, día 6 vs. día 7) y entre los días extremos (día 2 vs. día 7), tanto para LDH como para β -hCG. Se optó por Mann-Whitney en lugar de Kruskal-Wallis dado que el objetivo del análisis fue evaluar diferencias entre pares de días específicos (comparaciones a priori) y no la variabilidad global entre todos los grupos, lo cual es coherente con el diseño exploratorio del estudio. Dado el reducido número de comparaciones planificadas, no se aplicó corrección de Bonferroni. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con valores de $p < 0,05$. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (Media $\pm$ DS).

RESULTADOS

Viabilidad y diferenciación celular: En la Tabla N° 1 se muestran los valores medios de la actividad de LDH determinada en los sobrenadantes de los medios de cultivo expresados en UI/L, durante los días 2 al 7 de cultivo ($\eta = 5$ placentas; n explantes evaluados por día indicado en tabla). El día 1 se consideró el período de estabilización de los explantes y sus datos fueron excluidos del análisis comparativo. Los datos muestran que la actividad de LDH fue más elevada al segundo día de cultivo ($m = 224,6 \pm 30,4$ UI/L), con descenso progresivo hasta el quinto día ($m = 33,4 \pm 8,0$ UI/L) y un incremento nuevamente al séptimo día ($m = 105,7 \pm 8,6$ UI/L). Este patrón es compatible con la degeneración mecánica de las células periféricas del explante durante el procesamiento inicial, seguida de la estabilización del cultivo y la posterior degeneración natural de las células al final del período de cultivo. Las comparaciones planificadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre días consecutivos ($p > 0,05$), aunque se observó una tendencia biológicamente relevante de descenso entre el día 2 y el día 5, y de ascenso posterior hacia el día 7.

TABLA 1. Viabilidad celular de los cultivos de explantes de placenta humana determinada por la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Día de cultivo	N de explantes	Media $\pm$ DS LDH (UI/L)	p vs día anterior
2	5	224,6 $\pm$ 30,4	—
3	5	134,6 $\pm$ 19,2	ns
4	5	67,8 $\pm$ 8,5	ns
5	5	33,4 $\pm$ 8,0	ns
6	5	53,3 $\pm$ 25,6	ns
7	5	105,7 $\pm$ 8,6	ns

Nota: Medias $\pm$ desviaciones estándar. $\eta = 5$ placentas. Comparaciones entre días consecutivos mediante prueba de Mann-Whitney. ns = no significativo ($p > 0,05$). — = día de referencia (sin comparación). El día 1 corresponde al período de estabilización y fue excluido del análisis. (Tablas realizadas por los autores)

En la Tabla N° 2 se presentan los niveles de β -hCG determinados en los sobrenadantes del medio de cultivo durante los días 2 al 7 ($\eta = 5$ placentas; n explantes por día indicado en tabla). Se observó que las concentraciones de β -hCG fueron bajas en el segundo día ($171,8 \pm 21,3$ mUI/mg/proteína), con incremento progresivo hasta alcanzar el valor máximo al cuarto día ($545,8 \pm 18,4$ mUI/mg/proteína), seguido de una disminución progresiva hacia el séptimo día ($74,5 \pm 15,9$ mUI/mg/proteína). Aunque las comparaciones planificadas entre días consecutivos no alcanzaron significancia estadística ($p > 0,05$), la tendencia biológica observada (con un incremento de más del 200% entre los días 2 y 4 y una reducción posterior del 86%) es consistente con el ciclo de diferenciación y degeneración del sinciotrofoblasto descrito en la literatura, lo que es consistente con la competencia funcional del modelo evaluado ⁽¹⁷⁾.

TABLA 2. Niveles de Gonadotrofina Coriónica humana fracción beta (β -hCG) en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta humana

Día de cultivo	N de explantes	Media $\pm$ DS LDH (UI/L)	p vs día anterior
2	5	171,8 $\pm$ 21,3	—
3	5	323,0 $\pm$ 41,4	ns
4	5	545,8 $\pm$ 18,4	ns
5	5	360,0 $\pm$ 31,3	ns
6	5	187,0 $\pm$ 55,8	ns
7	5	74,5 $\pm$ 15,9	ns

Nota: Medias $\pm$ desviaciones estándar. η = 5 placentas. Comparaciones entre días consecutivos mediante prueba de Mann-Whitney. ns = no significativo ($p > 0,05$). — = día de referencia (sin comparación). El día 1 corresponde al período de estabilización y fue excluido del análisis. (Tablas realizadas por los autores)

Imunohistoquímica: El análisis inmunohistoquímico de los cortes de explantes de placenta (condición basal y postcultivo, día 7) reveló expresión positiva de β -hCG, hPL y PLAP en el citoplasma de las células del trofoblasto, con mayor intensidad de marcaje para hPL en comparación con β -hCG y PLAP (Figura N° 1). Estos hallazgos confirman que tanto el citotrofoblasto como el sinciotrofoblasto contribuyen a la producción de estas hormonas placentarias durante el período de cultivo ⁽¹⁸⁻¹⁹⁾.

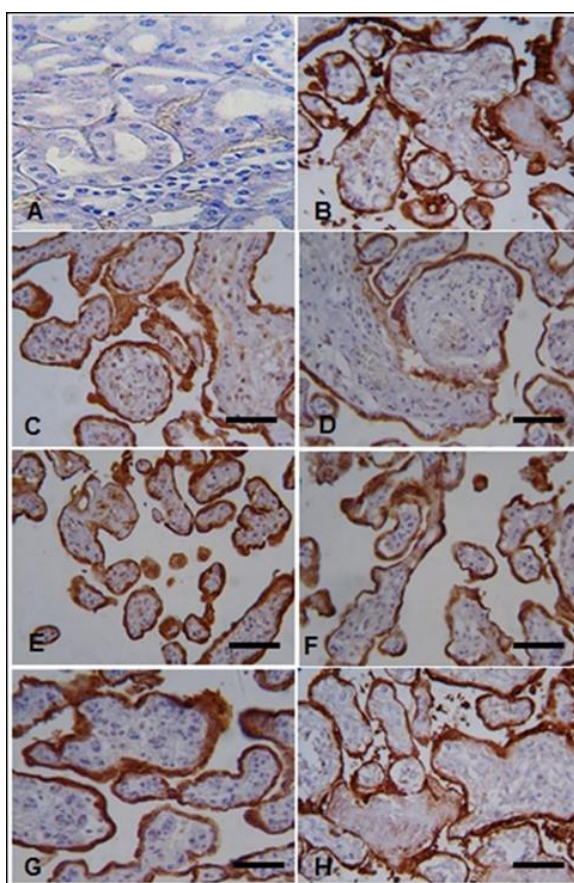


Figura 1. Cortes histológicos de explantes de placenta humana marcados inmunohistoquímicamente con: Gonadotrofina Coriónica Humana fracción beta (β -hCG), Lactógeno Placentario Humano (hPL) y Fosfatasa Alcalina Placentaria (PLAP). A: Control Negativo (Riñón); B: Control Positivo (Placenta). C: Explante marcado con β -hCG, día basal. D: Explante marcado con β -hCG, día postcultivo. E: Explante marcado con hPL, día basal. F: Explante marcado con hPL, día postcultivo. G: Explante marcado con PLAP, día basal. H: Explante marcado con PLAP, día postcultivo. Aumento: 400X.

En los cortes postcultivo se observó la presencia de sinciciotrofoblastos periféricos de gran tamaño con citoplasma vacuolado, distribuidos alrededor de los vasos sanguíneos, así como citotrofoblastos mononucleados con citoplasma claro localizados próximos al sincicio. Esta distribución celular, junto con la presencia de vasos sanguíneos, eritrocitos, células y fibras del tejido conectivo en el estroma de las vellosidades, indica la preservación de la arquitectura histológica placentaria durante el período de cultivo. Con respecto a los marcadores inmunológicos, los resultados se presentan en la Figura N° 2. Los marcadores CD45⁺ (antígeno leucocitario común) y CD68⁺ (macrófagos) mostraron una mayor representación celular en el estroma de las vellosidades placentarias en comparación con el marcador CD3⁻. Las células CD45⁺ y CD68⁺ fueron identificadas preferentemente dentro del estroma velloso, lo que es consistente con el patrón normal de distribución de macrófagos placentarios (células de Hofbauer) y leucocitos en el tejido placentario (18-20).

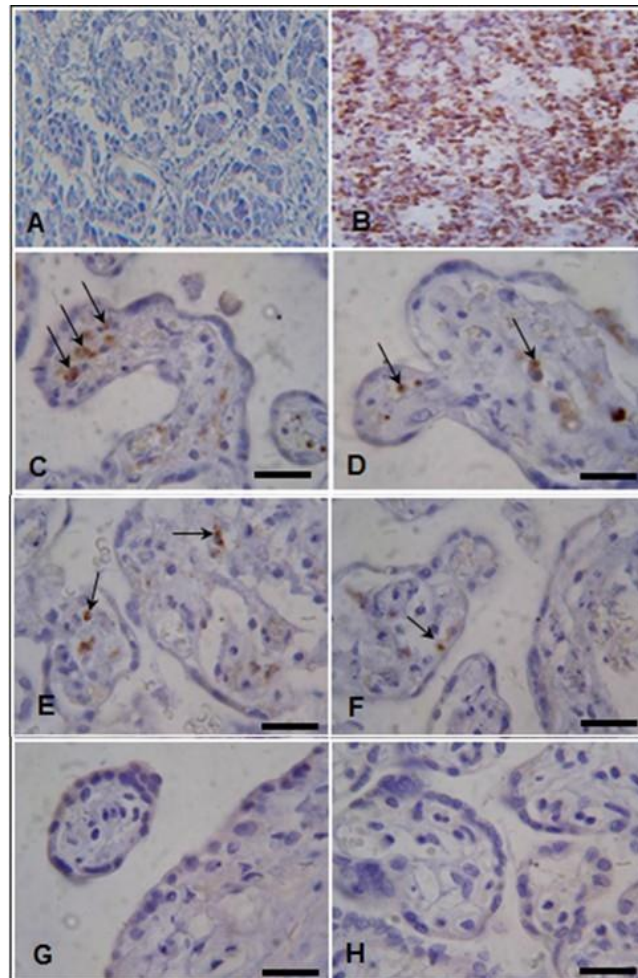


Figura 2. Cortes histológicos de explantes de placenta humana marcados inmunohistoquímicamente con: Antígeno Leucocitario Común (CD45⁺), Macrófagos (CD68⁺) y células CD3⁻ (fenotipo compatible con células NK deciduales: CD56bright/CD16⁻/CD3⁻). A: Control Negativo (Riñón); B: Control Positivo (Bazo). C: Explante marcado con CD45⁺, día basal. D: Explante marcado con CD45⁺, día postcultivo. E: Explante marcado con CD68⁺, día basal. F: Explante marcado con CD68⁺, día postcultivo. G: Explante marcado con células CD3⁻, día basal. H: Explante marcado con células CD3⁻, día postcultivo. Las flechas negras indican células positivas para cada marcador respectivo en el estroma velloso. Aumento: 400X.

DISCUSIÓN

Los cultivos de explantes de placenta humana constituyen un modelo experimental consolidado para el estudio del interfaz materno fetal, dado que conservan la arquitectura tisular tridimensional de las vellosidades y las interacciones celulares propias del órgano, características que se pierden en los cultivos de células aisladas ^(7,9-10). A diferencia de las líneas celulares trofoblásticas como BeWo o JEG-3, los explantes placentarios mantienen simultáneamente la presencia de citotrofoblasto, sinciotrofoblasto, células de Hofbauer y estroma conectivo, permitiendo la evaluación de respuestas biológicas integradas ante estímulos farmacológicos, inflamatorios u hipóxicos ^(8,11).

Se ha reportado una amplia variabilidad metodológica en los cultivos de explantes de placenta a término, que incluye diferencias en la composición del medio de cultivo, la tensión de oxígeno, el tamaño de los explantes y los protocolos de viabilidad, lo que dificulta la comparación entre estudios ⁽⁷⁻⁸⁾. En el presente trabajo se buscó estandarizar y consolidar una condición de cultivo con base en la evaluación integrada de viabilidad, diferenciación funcional y morfología celular, priorizando la eficiencia de costos y la reproducibilidad del protocolo.

La viabilidad celular fue evaluada mediante la actividad de la LDH en el sobrenadante del medio de cultivo, la cual refleja el daño de la membrana plasmática y la liberación del contenido citosólico de las células dañadas ⁽¹⁵⁾. El patrón temporal observado, incremento en el segundo día, descenso progresivo hasta el quinto día y nuevo ascenso al séptimo día, concuerda con hallazgos reportados en la literatura para este tipo de modelo ⁽⁷⁻⁹⁾. El aumento inicial de LDH en los días 2–3 es atribuido a la degeneración mecánica de las células periféricas del explante durante el procesamiento y el corte, fenómeno que disminuye con la estabilización progresiva del cultivo ⁽⁹⁾. La disminución sostenida hasta el día 5 refleja la integridad celular durante la fase activa de diferenciación, mientras que el incremento final en el día 7 indica el inicio del deterioro degenerativo natural propio del final del período de cultivo ⁽⁷⁻⁸⁾.

Estos resultados son consistentes con los de Kupper *et al.*, ⁽⁹⁾ quienes al comparar cultivos de explantes placentarios bajo condiciones de flujo versus estáticas, documentaron un patrón similar de liberación de LDH. Asimismo, coinciden con los datos de Tekkatte *et al.*, ⁽⁷⁾ quienes identificaron que un período de estabilización de 24–48 horas es crítico antes de iniciar los ensayos. Nuestros hallazgos sustentan que este paso metodológico es esencial para garantizar la viabilidad del modelo y reducir el impacto del daño mecánico inicial.

La diferenciación del sinciotrofoblasto fue evaluada mediante la cuantificación de β -hCG en el sobrenadante del medio de cultivo. La β -hCG es sintetizada exclusivamente por el sinciotrofoblasto y su secreción refleja tanto la viabilidad como la actividad secretora de esta población celular ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾. El perfil temporal observado, ascenso desde el día 2 hasta el pico máximo del día 4, seguido de descenso progresivo hasta el día 7, coincide con el patrón reportado en estudios previos con explantes de placenta a término ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾. Este comportamiento refleja la secuencia biológica de fusión del citotrofoblasto hacia el sinciotrofoblasto (días 2–4) y el posterior inicio de la degeneración apoptótica del sincicio (días 5–7) ⁽¹⁷⁾.

Aunque las comparaciones estadísticas entre días consecutivos no alcanzaron significancia ($p > 0,05$), la tendencia biológica observada sugiere diferenciación activa en el modelo. Esta ausencia de significancia estadística es atribuible al reducido tamaño muestral y a la variabilidad biológica inherente al modelo. En este sentido, si bien la prueba de Mann-Whitney no detectó diferencias significativas entre pares de días, la tendencia temporal es biológicamente coherente y consistente con la literatura. Estudios con mayor poder estadístico permitirían confirmar estas diferencias ⁽⁷⁻¹⁷⁾. Esta matización es importante para la interpretación correcta de los resultados: la ausencia de significancia estadística no implica ausencia de diferenciación funcional, sino que refleja las limitaciones estadísticas inherentes al diseño metodológico del estudio. El comportamiento observado en la viabilidad y diferenciación celular es esperable en cultivos ex vivo de tejido placentario y refleja la dinámica natural de adaptación, estabilización y deterioro tisular progresivo. Los datos sugieren que la ventana funcional óptima se ubica entre los días 2 y 5, período en el que la actividad de LDH es mínima y la secreción de β -hCG alcanza su pico máximo, indicando viabilidad y diferenciación trofoblástica activa simultáneas.

Por otra parte, la aparente discordancia entre la caída de β -hCG en el sobrenadante a partir del día 5 y el mantenimiento de su expresión inmunohistoquímica en el trofoblasto postcultivo merece una interpretación precisa. Este fenómeno no refleja pérdida de diferenciación funcional sino, más probablemente, una reducción progresiva de la capacidad secretora del sinciciotrofoblasto, con mantenimiento de la síntesis proteica, pero deterioro de los mecanismos de exocitosis y polaridad celular. En consecuencia, la β -hCG continúa siendo producida, pero se acumula intracelularmente en lugar de ser exportada al medio de cultivo. Este patrón es consistente con el proceso de senescencia del sinciciotrofoblasto terminal descrito en la literatura, en el cual la integridad biosintética se preserva más tiempo que la competencia secretora⁽¹⁷⁾. Estos hallazgos indican que la determinación en sobrenadante refleja actividad secretora activa, mientras que la inmunohistoquímica refleja síntesis sostenida; ambos parámetros son complementarios y deben interpretarse en conjunto para una caracterización funcional completa del explante.

La formulación del medio de cultivo RPMI-1640 suplementado proporcionó las condiciones metabólicas y hormonales necesarias para sostener la viabilidad y diferenciación de los explantes durante 7 días. La literatura especializada documenta que los glucocorticoides estimulan la producción de hCG y promueven la diferenciación del citotrofoblasto hacia sinciciotrofoblasto, mientras que el ácido retinoico actúa como regulador transcripcional de genes implicados en la diferenciación trofoblástica⁽²²⁾. La insulina favorece la diferenciación y la secreción de hCG en células trofoblásticas, y el suero fetal bovino aporta factores de crecimiento y minerales esenciales para el mantenimiento del cultivo⁽²²⁾.

Tekkatté *et al.*,⁽⁷⁾ demostraron que la selección del tipo de medio de cultivo y los suplementos tienen un impacto directo sobre la viabilidad y la secreción de marcadores trofoblásticos en explantes placentarios, enfatizando la necesidad de estandarizar estos parámetros para garantizar la reproducibilidad entre laboratorios. En esta misma línea, Aye *et al.*,⁽²²⁾ documentaron que los medios de cultivo con composición más similar a la del plasma humano mejoran la proliferación y diferenciación de células madre trofoblásticas en comparación con medios convencionales como DMEM-F12, lo que resalta la importancia de la optimización del medio como variable metodológica crítica.

Por otra parte, el análisis inmunohistoquímico confirmó la preservación de la arquitectura histológica durante el periodo de cultivo. La mayor intensidad de marcaje con hPL es consistente con la fisiología del trofoblasto a término, donde el sinciciotrofoblasto maduro secreta preferentemente hPL⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. La expresión de PLAP confirma la diferenciación trofoblástica sostenida⁽¹⁸⁾. Los hallazgos inmunohistoquímicos de los marcadores leucocitarios son consistentes con la distribución normal de células en el tejido placentario a término⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Las células CD45⁺ y CD68⁺ identificadas en el estroma veloso corresponden a los macrófagos placentarios (células de Hofbauer), las células inmunológicas residentes predominantes en el estroma de las vellosidades, cuya preservación en los explantes postcultivo indica integridad del modelo⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Respecto al marcador CD3⁻: es importante precisar que la ausencia de expresión de CD3 (CD3⁻) no es un marcador específico de células NK. Las células NK deciduales se caracterizan por el fenotipo CD56bright/CD16⁻/CD3⁻, siendo la negatividad para CD3 solo indicativa de ausencia de linfocitos T⁽²¹⁾. Por tanto, las células CD3⁻ identificadas en el estroma veloso son compatibles con un fenotipo NK pero no pueden ser clasificadas como tales exclusivamente sobre la base de este marcador. Esta consideración no afecta la validez general del modelo, dado que las células NK uterinas (uNK) se localizan predominantemente en la decidua y no en las vellosidades coriónicas⁽²⁰⁻²¹⁾.

El modelo validado en el presente estudio ofrece una plataforma experimental reproducible para el estudio de mecanismos fisiopatológicos placentarios de relevancia clínica. En particular, su aplicación es pertinente para la evaluación de los efectos del MgSO₄ sobre la producción de citocinas, el estrés oxidativo y la diferenciación trofoblástica, en el contexto de la preeclampsia y la neuroprotección fetal⁽¹²⁻¹⁴⁾. Estudios realizados en Venezuela con modelos similares de explantes placentarios han documentado el efecto del MgSO₄ y de la hipoxia sobre membranas de sinciciotrofoblasto, lo que subraya la pertinencia del presente modelo⁽¹⁴⁾. Asimismo, el modelo es adecuado para estudios de hipoxia placentaria, inflamación y modulación farmacológica, lo que amplía su potencial de citación e impacto en el ámbito de la medicina materno fetal.

Es importante señalar que el presente estudio presenta las siguientes limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados: (1) el tamaño muestral reducido ($n = 5$ placentas), justificado por el carácter metodológico del estudio y las restricciones en la disponibilidad de tejido, limita el poder estadístico y la generalización de los hallazgos; (2) el diseño unicéntrico, realizado en el Hospital Universitario de Caracas, restringe la representatividad de la muestra a la población atendida en dicho centro; (3) el estudio incluyó únicamente placentas de tercer trimestre, por lo que los resultados no son extrapolables a etapas gestacionales previas; (4) los investigadores realizaron ensayos funcionales adicionales previos a la presentación del modelo (citocinas, marcadores de estrés oxidativo) que permitieron caracterizar con mayor profundidad el microambiente del cultivo, fortaleciendo la validación del modelo aquí presentado..

CONCLUSIONES

El modelo de cultivo de explantes placentarios humanos de tercer trimestre bajo las condiciones descritas (RPMI-1640 suplementado, 10% O₂, 5% CO₂) evidencia ser reproducible, viable y funcionalmente competente durante al menos 7 días. Este modelo preserva la arquitectura tisular de las vellosidades placentarias, mantiene la viabilidad del trofoblasto evaluada por la actividad de LDH y es consistente con la diferenciación funcional del citotrofoblasto hacia sinciciotrofoblasto, reflejada en la secreción dinámica de β -hCG con pico máximo al cuarto día de cultivo.

El período de estabilización de 24 horas previo al inicio de los ensayos experimentales es un requisito metodológico esencial para minimizar el efecto del daño mecánico inicial sobre las determinaciones biológicas. La inmunohistoquímica confirma la preservación de la expresión de hormonas placentarias (β -hCG, hPL, PLAP) y de los marcadores leucocitarios (CD45⁺, CD68⁺, CD3⁻) durante el período de cultivo, lo que otorga al modelo validez morfológica y funcional para estudios biomédicos *in vitro*.

Este modelo constituye una herramienta experimental valiosa, de bajo costo y adaptable, con aplicación directa para la investigación de mecanismos de inflamación, hipoxia y estrés oxidativo en tejido placentario humano, así como para la evaluación del efecto de intervenciones terapéuticas como el sulfato de magnesio. Asimismo, el modelo ofrece perspectivas de aplicación en ensayos de toxicidad farmacológica, permitiendo evaluar el efecto de fármacos o compuestos de interés clínico sobre la viabilidad y función del trofoblasto en tejido humano, sin recurrir a modelos animales con escasa equivalencia morfofuncional con la placenta humana. Su establecimiento en contextos latinoamericanos, donde la estandarización de este tipo de modelos es aún limitada, representa un aporte metodológico de relevancia regional.

Declaración de financiamiento y conflictos de interés: Este trabajo fue parcialmente apoyado por la subvención PG 09-6579-2006 del CDCH-UCV y por una subvención del Decanato de Postgrado USB. Los autores no reportan conflictos de interés. Los autores son los únicos responsables del contenido y la redacción del documento.

REFERENCIAS

1. Vornic I, Buciu VB, Furu CG, Zara F, Novacescu D, Barb AC, et al. The interplay of molecular factors and morphology in human placental development and implantation. *Biomedicines*. 2024;12(12):2908. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12122908>
2. Carter AM. Unique aspects of human placentation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):8099. <https://doi.org/10.3390/ijms22158099>
3. Fournier T. Human chorionic gonadotropin. *Adv Clin Chem*. 2020;95:101-127. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820050-6.00004-7>
4. Lee D, Joo JS, Hong JY. Multi-layered mechanisms of immunological tolerance at the maternal-fetal interface. *Immune Netw*. 2024;24(4):e30. <https://doi.org/10.4110/in.2024.24.e30>
5. Yang F, Jin L, Zheng Q. Dynamic function and composition changes of immune cells during normal and pathological pregnancy at the maternal-fetal interface. *Front Immunol*. 2019;10:2317. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02317>

6. James JL, Haider S, Gamage T, Knöfler M, Pollheimer J, Saleh L. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(18):3479-3496. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03104-6>
7. Tekkatte C, Lindsay SA, Duggan E, Castro-Martínez A, Hakim A, Saldana I, et al. Identification of optimal conditions for human placental explant culture and extracellular vesicle release. *iScience.* 2023;26(10):108046. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108046>
8. López-Guzmán C, García AM, Marín P, Vásquez AM. Assessment of the integrity and function of human term placental explants in short-term culture. *Methods Protoc.* 2024;7(1):16. <https://doi.org/10.3390/mps7010016>
9. Kupper N, Pritz E, Siwetz M, Guettler J, Huppertz B. Placental villous explant culture 2.0: flow culture allows studies closer to the in vivo situation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7464. <https://doi.org/10.3390/ijms22147464>
10. Simán CM, Sibley CP, Jones CJP, Turner MA, Greenwood SL. The functional regeneration of syncytiotrophoblast in cultured explants of term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(4):R1116-R1122. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.4.R1116>
11. Geldenhuys J, Rossouw TM, Lombaard HA, Ehlers MM, Kock MM. Disruption in the regulation of immune responses in the placental subtype of preeclampsia. *Front Immunol.* 2018;9:1659. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01659>
12. Wu Y, Kang F, Yang Y, Tao L, Chen Y, Li X. The protective effect of magnesium sulfate on placental inflammation via suppressing the NF- κ B pathway in a preeclampsia-like rat model. *Pregnancy Hypertens.* 2023;31:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2022.11.003>
13. Di Santo S, Malek A, Sager R, Andres AC, Schneider H. Trophoblast viability in perfused term placental tissue and explant cultures. *Placenta.* 2003;24(8-9):882-894. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(03\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(03)00142-9)
14. Abad C, Chiarello DI, Proverbio F, Benzo Z, Piñero S, Botana D, et al. Effect of hypoxia on the calcium and magnesium content, lipid peroxidation level, and Ca²⁺-ATPase activity of syncytiotrophoblast plasma membranes from placental explants. *Biomed Res Int.* 2014;2014:597357. <https://doi.org/10.1155/2014/597357>
15. Lissaman AC, James JL, Chamley LW, Nursalim Y. Modelling human placental villous development: designing cultures that reflect anatomy. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(7):384. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04407-x>
16. Gehl AL, Klawitter DS, Wissenbach U, Cole M, Wesely C, Löhr H, et al. The proteomic landscape of trophoblasts unravels calcium-dependent syncytialization processes and beta-chorionic gonadotropin (β -hCG) production. *Reprod Biol Endocrinol.* 2025;23(1):34. <https://doi.org/10.1186/s12958-025-01362-7>
17. Hawkins A, Pantazi P, Yang L, Coyne CB, Bokun V, Lemme-Dumit J, et al. Long-term culture and passaging of term trophoblast for the investigation of syncytiotrophoblast function. *Placenta.* 2024;155:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2024.08.014>
18. Kumar A, Sharma S, Costantine MM, Rood KM, Urrabaz-Garza R, Jacob J, et al. Placental alkaline phosphatase (PLAP): is it exclusively placental? *Placenta.* 2025;159:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2025.01.001>
19. Gieras W, Dawid M, Milewicz T, Rak A. Effect of vaspin on endocrine function in human placenta. In vitro studies on BeWo cells and villous explants from the third trimester of pregnancy. *J Physiol Pharmacol.* 2025;76(4). [citado 4 mayo 2026]. Disponible en: https://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/04_25/articles/09_article.html
20. Ikumi N, Mahajan S, Tilburgs T, Koenig ZA, Gray C. Purification of primary human placental leukocytes to study maternal-fetal interactions. *STAR Protoc.* 2023;4(2):102277. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102277>
21. Feyaerts D, Comitini G, Joosten I, Benner M, van der Heijden OWH, van der Molen RG, et al. NK cell receptor profiling of endometrial and decidual NK cells reveals pregnancy-induced adaptations. *Front Immunol.* 2024;15:1353556. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1353556>

22. Aye IL, Avellino G, Deshmukh R, Tardito S, Rogers SN, Smith GCS, et al. Physiologically relevant culture medium Plasmax improves human placental trophoblast stem cell function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023;324(5):C1149-C1160. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00581.2022>