RODRIGO BARBANO WEINGRILL

EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA Ccl25 E SEU
RECEPTOR Ccr9 NO PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO
EMBRIONÁRIA EM CAMUNDONGOS.

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e
Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia
Celular e Tecidual

Versão original

São Paulo
2015

RODRIGO BARBANO WEINGRILL

EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA Ccl25 E SEU
RECEPTOR Ccr9 NO PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO
EMBRIONÁRIA EM CAMUNDONGOS.

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e
Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia
Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Estela Maris
Andrade Forell Bevilacqua

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Weingrill, Rodrigo Barbano.

Expressão da quimiocina Ccl25 e seu receptor Ccr9 durante o processo de implantação embrionária em camundongos / Rodrigo Barbano Weingrill. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Estudo das interações materno-fetais e da biologia do trofoblasto.

Versão do título para o inglês: Expression of chemokine (C-C) motif 25 ligand and its receptor during mouse embryo implantation.

1. Implantação embrionária 2. Blastocisto 3. Cone ectoplacentário
4. Quimiocinas 5. Ccl25 6. Ccr9 I. Bevilacqua, Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB089/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rodrigo Barbano Weingrill.

Título da Tese: Expressão da quimiocina Ccl25 e seu receptor Ccr9 durante o processo de implantação embrionária em camundongos.

Orientador(a): Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 136 nas fls. 80 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Estela Bevilacqua, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Expressão de Ccl25 e seu receptor Ccr9 em blastocistos de camundongo e seu papel no processo de implantação embrionária** do qual participou(aram) o(s) alunos **Rodrigo Barbano Weingrill**, e o pesquisador **Ciro Dresch Martinhago**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **05.03.10**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 08 de março de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada *Expressão de Ccl25 e seu receptor Ccr9 no processo de implantação embrionária em camundongos*, registrada sob nº 021, nas fls. 29, do livro 03, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 07 de maio de 2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da **Lei Federal nº 11.794**, o Dr. (Dra.) Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua (Investigador Principal) e os membros da equipe Rodrigo Barbano Weingrill, Rosângela Augusto de Oliveira Farias. Esta licença de uso de animais expira em 07 / 05 / 2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal *Expression of Ccl25 and of its receptor Ccr9 in embryonic implantation in mice*, registered as Number 021, in pages 29 of book 03, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 05 / 07 / 2015.

Under this license, Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua (Principal Investigator) and team members Rodrigo Barbano Weingrill, Rosângela Augusto de Oliveira Farias are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the **Brazilian Federal Law nº 11.794**.

This license expires in 05 / 07 / 2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 07 de maio de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. Ana Paula Lepique
Secretária- CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradecer, não é a mais simples tarefa, dentre todas as realizadas nesta caminhada.

Aos meus pais Pedro Weingrill e Paula Barbano, meu muito obrigado. Obrigado por apoiar, obrigado por ensinar, obrigado por insistir, seja qual fosse o momento, obrigado por me mostrar que esta jornada seria longa, porém, construtiva para todos nós. Eu realmente não estaria aqui hoje, se não fosse por vocês dois!!

Minha irmã Fernanda, minha tia Rita, minha avó Teny, mesmo que estando por vezes mais distante de vocês do que eu gostaria, sempre estive com vocês em pensamento, especialmente nos momentos difíceis.

Minha noiva Paula Chehade, muito obrigado por me suportar em todos aqueles dias em que eu pensei que não conseguiria e você disse: você vai conseguir!!!! Nós conseguimos.

Minha cunhada e amiga, Chayrra Chehade, obrigado por todas as dicas e conselhos!

A Dra, Aline Lorenzon e ao Dr. Alexandre Borbely, seus conselhos sempre fizeram bem, e sua amizade mais ainda. Levarei comigo, o exemplo de dois grandes pesquisadores, que mesmo jovens, são exemplo de comprometimento no dia a dia do laboratório.

A Dra. Simone Correa, Dra. Elaine Cardoso, Dra. Sara Gomes e a Dra. Jusciele Moreli, suas broncas e conselhos nunca serão esquecidos. Sua amiga, muito menos.

A Rose, nossa técnica, amiga, mãe, irmã...Obrigado por me ajudar em todos os dias em que precisei. Obrigado por ensinar os caminhos e atalhos dentro de um laboratório.

Ao Dr. Ciro Dresh Martinhago, por me co-orientar durante os experimentos de biologia molecular e por ser um amigo fora do dia a dia do laboratório.

Ao Prof. Dr. Sérgio F. de Oliveira, por permitir a utilização do material e equipamentos necessários para os ensaios de imunohistoquímica. Obrigado, também, por me mostrar o funcionamento de um curso de graduação, da teoria à prática.

A todas as meninas do laboratório, que passaram ou ainda estão conosco, lembrarei dos bons e maus momentos com saudades.

Aos meus amigos Dr. Renato Mayrinck, a Dra. Juliane Sanches e a Fernanda Barrence, lembrarei sempre de todos os dias em que subi ao quarto andar, fosse para pedir uma ajuda ou para tomar um café!

A Profa. Dra. Estela Bevilacqua, agradeço imensamente por me ensinar, me corrigir, e principalmente me mostrar que tudo é possível, desde que tenhamos determinação e seriedade. Acredito que quando mais o tempo passa, maior meu respeito por você. A professora sempre foi e sempre será um exemplo a ser seguido. E eu tenho o maior orgulho do mundo em dizer que fui seu aluno! Entre brigas, risadas e prazos apertados, lembrarei sempre de uma grande orientadora, seja na ciência ou seja nos caminhos da vida.

Por fim, a todos que por ao menos um minuto, participaram desta jornada, muito obrigado! Sempre tive a todos como uma grande família, uma família que eu levarei comigo para toda vida!

Ao departamento de Biologia Celular e Tecidual, a CAPES e CNPQ, muito obrigado pelo suporte durante toda pós graduação.

RESUMO

Weingrill, R.B. **Expressão de Ccl25 e seu receptor Ccr9 durante o processo de implantação embrionária em camundongos**. 2015. 82 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que, de modo geral, facilitam o recrutamento, a migração e o “*homing*” de leucócitos a tecidos efetores não- linfóides. A expressão destas moléculas tem também sido relacionada a funções específicas durante o processo de implantação embrionária. Neste estudo foi analisada a expressão gênica e protéica, uterina e embrionária da quimiocina *Ccl25* e de seu receptor *Ccr9* nas fases iniciais da implantação embrionária (dias 3,5, 4,5, 5,5 e 7,5 de gestação). Por meio de reações imunohistoquímicas e de citometria de fluxo, foram identificadas as populações celulares envolvidas nesta expressão. Também, foram realizados ensaios de quimiotaxia com o silenciamento da expressão de *Ccl25* (ODNs-Antisense) nas células trofoblásticas, para a avaliação das atividades desta quimocina. Os resultados demonstraram um aumento significativo na produção de *Ccl25* ($p < 0,0001$) no cone ectoplacentário aos 7,5 dias de gestação (dg), quando comparado ao blastocisto aos 4,5 e 5,5dg. A interface materna apresentou uma expressão basal de *Ccl25* durante a fase de periimplantação. O receptor *Ccr9* teve seus transcritos detectados em fragmentos endometriais especialmente aos 7,5dg ($p < 0,05$). *Ccl25* foi imunolocalizado no epitélio uterino luminal e glandular, enquanto que o receptor *Ccr9* foi imunoreativo nas células leucocitárias endometriais, durante este período. Ensaios de migração com cones ectoplacentários e blastocistos mostraram um aumento no percentual de migração de células mononucleares do sangue periférico (PBMc) ($10,33 \pm 0,47 \times 10^4$ e $10,66 \pm 0,35 \times 10^4$, respectivamente). Esses valores foram semelhantes à adição de $0,5 \mu\text{g/mL}$ ($10,45 \pm 1,39 \times 10^4$) e $1 \mu\text{g/mL}$ ($12,23 \pm 0,75 \times 10^4$) de *Ccl25* recombinante e significativamente maior do que o controle ($4,13 \pm 1,82 \times 10^4$). O silenciamento do gene *Ccl25* nas culturas de cones ectoplacentários co-cultivados com PBMcs levou a uma redução significativa do potencial migratório das PBMcs ($7 \pm 1,63$) comparado ao controle (ODN scramble, $13 \pm 2,16$). Resultados similares foram observados quando o receptor *Ccr9* foi imunobloqueado em PBMcs ($6,65 \pm 1,24$; $p < 0,05$) e co-cultivado com cones ectoplacentários. *Ccl25* não apresentou efeito proliferativo, apoptótico e/ou invasivo sobre as células do cone ectoplacentário. Utilizando citometria de fluxo, foram identificadas alterações no percentual de células monocíticas, dendríticas e linfocitárias que expressam *Ccr9* em sua superfície durante a gestação. Nossos resultados sugerem o estabelecimento de uma comunicação embrião (células trofoblásticas) - endométrio (células do sistema imunológico), via *Ccl25/Ccr9*. Esses achados são relevantes para a compreensão das interações blastocisto/sistema imunológico materno no estabelecimento dos mecanismos imunoreguladores durante a implantação embrionária.

Palavras chaves: Implantação embrionária. Blastocisto. Cone ectoplacentário. Quimiocinas. *Ccl25*. *Ccr9*.

ABSTRACT

WEINGRILL, R.B. **Expression of chemokine (C-C) motif 25 and its receptor during mouse embryo implantation.** 2015. 82 p. Ph. D. Thesis (Cell Biology and Tissue) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Chemokines are chemotactic cytokines that generally facilitate recruitment, migration and homing of leukocytes to the non-lymphoid effector tissues, and other biological processes. The gene expression of these molecules has also been related to specific functions during the process of embryo implantation. In this study, we analyzed the gene and protein, uterine and embryonic expression of Ccl25 chemokine and its receptor Ccr9 in early stages of embryo implantation (days 3.5, 4.5, 5.5 and 7.5 of gestation). By using immunohistochemistry and flow cytometric assays, cell populations involved in this expression were identified. In addition, chemotaxis assays were also performed after silencing of Ccl25 (ODNs-antisense) in trophoblast cells. The results showed a significant increase in *Ccl25* ($p < 0.0001$) expression by ectoplacental cone on day 7.5 of gestation (gd) when compared to 4.5 and 5.5 gd in blastocysts. The maternal interface presented a *Ccl25* basal expression during the periimplantation gestational days. *Ccr9* receptor had transcripts detected in endometrial fragments especially on day 7.5 of gestation ($p < 0.05$). Ccl25 was immunolocalized in luminal and glandular uterine epithelium, while immunoreactive cells Ccr9 was found in endometrial leukocytes during this period. Migration assays using ectoplacental cone and blastocysts showed an increase in the percentage of migration of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ($10.33 \pm 0.47 \times 10^4$ and $10.66 \pm 0.35 \times 10^4$, respectively). These values were similar to the addition of 0.5 mg/mL ($10.45 \pm 1.39 \times 10^4$) and 1/mL ($12.23 \pm 0.75 \times 10^4$) of recombinant Ccl25 and significantly higher in comparison with the control ($4.13 \pm 1.82 \times 10^4$). *Ccl25* gene silenced in cultured ectoplacental cones co-cultured with PBMCs showed a significant reduction in the PBMC migratory potential (7 ± 1.63) compared to control (scramble ODN, 13 ± 2.16). Similar results were observed when Ccr9 was immunoblocked in PBMCs (6.65 ± 1.24 ; $p < 0.05$) and co-cultured with ectoplacental cone. Ccl25 showed no proliferative, apoptotic and/or invasive effect on the ectoplacental cone cells. Using flow cytometry, changes in the percentage of monocytes, dendritic cells and lymphocytes expressing Ccr9 were identified during pregnancy. Our results suggest the establishment of an endometrium (immune cells) - embryo (trophoblast cells) dialogue via Ccl25/CCR9. These findings are relevant for understanding the interactions between blastocyst and maternal immune system in the establishment of immunoregulatory mechanisms during implantation.

Key words: Embryo implantation. Chemokines. Blastocyst. Ectoplacental cone. Ccl25. Ccr9.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - *Primers* (IDT DNATechnologies, USA) desenhados para os experimentos de qPCR em tempo real. *Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 25 (Ccl25), transcript variant 1, mRNA; Reference Sequence: NM_009138.3; Mus musculus chemokine (C-C motif) receptor 9 (Ccr9), transcript variant 1, mRNA; NCBI Reference Sequence: NM_001166625.1; Mus musculus tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (Ywhaz), transcript variant 1, mRNA; Reference Sequence: NM_011740.3.*

TABELA 2 - Sequência de nucleotídeos desenhados para silenciamento gênico de Ccl25. (*) indicam ligações tiofosfatadas. (3FluorT) fluorocromo (FITC). Desenhados por: IDT DNA Technologies, IA, USA.

TABELA 3 - Caracterização das populações de células mononucleares do sangue periférico durante o período de implantação embrionária; CD3;CD4;CD8 α ;CD11c;CD11b;F4/80; α 4 β 7(R&D Systems, MN, USA); Ccr9-PE/Cy5(anti-CCR9-Cy5.5 (IgG2a de rato anti-CCR9, CD199, BioLegend, CA, EUA; IgG de cabra anti-IgG de rato - PE/Cy5.5, Abcam, EUA).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Esquema demonstrando a interação de leucócitos com as moléculas de superfície celular do endotélio para sua migração para os tecidos. A interação da molécula de adesão MAdCAM com a integrina $\alpha 4\beta 7$ após a ativação do leucócito por meio da ligação específica de CCL25 com seu receptor CCR9. Esta ligação ativam a apresentação de integrinas $\alpha 4\beta 7$ na superfície celular do endotélio, aumentando a estabilidade das ligações e possibilitando a passagem a do leucócito para os tecidos. Modificado de (AGACE, 2006).

FIGURA 2 - Expressão gênica de *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* durante a fase de implantação embrionária. A quantificação relativa dos transcritos de *Ccl25* e *Ccr9* foi acessada por RT-qPCR. **(a)** Expressão de *Ccl25* em blastocistos aos 3,5, 4,5 e 5,5 dias de gestação e em cones ectoplacentários aos 7,5 dias de gestação. **(b)** Expressão gênica de *Ccl25* no compartimento materno nos dias 3,5, 4,5, 5,5 (endométrio) e 7,5 dias de gestação (decídua). **(c)** Abundância de transcritos de *Ccr9* no compartimento materno nos dias 3,5, 4,5, 5,5 (endométrio) e 7,5 dias de gestação (decídua). **(d)** Expressão de *Ccr9* em PBMCs obtidos de fêmeas aos 3,5, 4,5, 5,5 e 7,5 dias de gestação. One-Way ANOVA; * $p < 0.0001$; ** $p < 0.05$.

FIGURA 3 - Morfologia **(a-b)** e imunolocalização de Ccl25 **(c-k)** em blastocistos **(c-f)** e em sítios de implantação **(g-j)**. **(a-b)** Preparado histológico corado pela Hematoxilina-Eosina de um sítio de implantação aos 3,5 dias de gestação. A ponta de seta indica um linfócito na luz uterina. **(b)** Blastocisto; (ep) Epitélio uterino; (en) Endométrio. **(c)** Blastocisto **(b)** expandido aos 4,5 dias de gestação. Notar a reatividade das células superficiais (trophoblast) para o anticorpo anti-Ccl25 conjugado a FITC (verde). **(d-f)** Blastocisto **(b)** aos 5,5 dias de gestação com reatividade (verde) para a proteína Ccl25 nas células trofoblásticas gigantes (inserto, maior aumento da região # da Figura 3f), que se dispõem ao redor do embrião (*) **(d)**, Anti-Ccl25-FITC; **e**, DAPI: núcleos azuis). **f**, Imagem sobreposta das Figuras **d-e**. **(h-j)** Epitélio glandular **(g)** reativo ao anti-Ccl25 em sítios de implantação aos 4,5 dias de gestação **(h)**, Anti-Ccl25-FITC; **i**, DAPI: núcleos azuis; , Imagem sobreposta das Figuras **h-i**). **(k)** Controle em que o anticorpo primário foi omitido da reação (imagens sobrepostas filtro FITC/DAPI). (ep) Epitélio uterino e (en) endométrio de um sítio de

implantação aos 4,5 dias de gestação. Inserto, blastocisto (b) aos 4,5 dias de gestação.

FIGURA 4 - Imunolocalização de Ccl25 em cones ectoplacentários de 7,5 dias de gestação. (a) Preparado histológico corado pela Hematoxilina-Eosina. Notar que células trofoblásticas gigantes revestem externamente o embrião na região polar (gt) aonde compõem o cone ectoplacentário (ec) e na região mural (mt). Essas células estão em contato direto com a decídua (d). (b-g) Imunolocalização de Ccl25 é observada nas células trofoblásticas murais (mt) e do cone ectoplacentário (ec). (e) Controle em que o anticorpo primário foi omitido da reação (FITC/DAPI). Barra em a-d,f-g= 100 µm; em b = 20 µm; em e = 200 µm. (b,f) FITC. (c) DAPI. (d-e,g) Sobreposição das imagens com filtro FITC/DAPI.

FIGURA 5 - Imunolocalização de Ccl25 (TRITC: vermelho) e Ccr9 (FITC: verde) em sítios de implantação aos 5,5 dias de gestação. (a-d) A colocalização de Ccr9 e Ccl25 mostra células do epitélio uterino (ep) reativas ao Ccl25 (vermelho) e células Ccr9⁺ nas porções mais profundas do endométrio (en), próximo ao miométrio (m). (e-g) Células Ccr9⁺ encontradas na região mesometrial em estreita proximidade a um vaso sanguíneo. (h-k) Reação controle em que os anticorpos primários foram omitidos. Barra = 100 µm em a-d; em e-g = 200 µm. (a, d-e, g-h,k) DAPI (núcleos, azuis). (b,i) TRITC. (c,f,j) FITC. (d,k) imagens com filtro TRITC, FITC e DAPI, sobrepostas. (f) imagens com filtro FITC e DAPI sobrepostas.

FIGURA 6 - Expressão de Ccl25 e seu receptor Ccr9 em cones ectoplacentários e em sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação. (a-d) Dupla marcação para Ccl25 (TRITC: vermelho) e Ccr9 (FITC: verde) na região do cone ectoplacentário (ec). As setas (em b e d) indicam a presença de leucócitos reativos ao anticorpo anti Ccr9 (FITC) nas malhas das células trofoblásticas Ccl25⁺ (em c e d, vermelho). (e-h) Controle em que os anticorpos primários foram omitidos da reação. d – decídua. (a,d-e,h) DAPI. (b,g) Filtro para FITC. (c,f) Filtro para TRITC. (d,h) Imagens sobrepostas (DAPI/FITC/TRITC). Em a-d, barra = 100 µm; em e-h, barra = 200 µm.

FIGURA 7 - Cones ectoplacentários cultivados por 48h. As figuras mostram cones ectoplacentários tratados com ODN-*Ccl25 antisense* (a-c) e com ODN-*scramble antisense* (d), ambos conjugados a FITC. Notar em (c), a imunofluorescência em células trofoblásticas gigantes. (e) A abundância dos transcritos de *Ccl25* nos cones ectoplacentários diminuiu significativamente após tratamento com ODN anti-*Ccl25* (*Ccl25*^{-/-}) quando comparados aos grupos controle (não tratado) e ODN-*scramble* (***p*<0,001). (a,b,d) 20x. (c) 40x. (a-d) núcleos corados em azul pelo DAPI.

FIGURA 8 - (A-D) Expressão proteica da quimiocina *Ccl25* pelas células trofoblásticas (Tr) do cone ectoplacentário (Cn). (B,D) *Ccl25* foi imunolocalizado (verde) no citoplasma de células gigantes do cone ectoplacentário. (C) Controle de reação em que o anticorpo primário foi omitido. (A) Microscopia de luz invertida, Nomarski. (B-D) Filtro DAPI. (B,D) Sobreposição das imagens com filtro FITC/DAPI. Em A-C barra = 100 µm, em D = 50 µm. (E) O histograma mostra os valores médios (± desvio padrão, barras) de células que migraram após 48h de cultura em ensaios de quimiotaxia utilizando diferentes concentrações de *Ccl25* recombinante de camundongo (0,25, 0,5 e 1,0 µg/mL), culturas de blastocistos (Blast), culturas de cones ectoplacentários (EC), culturas de cones ectoplacentários tratados com ODN-*Ccl25* (*Ccl25*^{-/-}), ulturas de cones ectoplacentários tratadas com ODN-*scramble* (Scr) e PBMCs previamente tratados com anticorpos anti Ccr9. ***p*<0,05 em relação ao controle e ao tratamento com *Ccl25* recombinante na concentração de 0,25 µg/mL.

FIGURA 9 - Efeito de *Ccl25* recombinante sobre a proliferação (a, BrdU), morte celular por apoptose (b, TUNEL) e capacidade invasiva das células trofoblásticas (c, ensaio de invasão) em culturas de cones ectoplacentários. Nenhum ensaio mostrou diferenças significativas em relação ao respectivo controle sem tratamento.

FIGURA 10 - Percentual de células CD3, CD11c, F4/80+ e F4/80⁻ em populações de células mononucleares do sangue periférico (*n*=3, PBMC). (a) Linfócitos T CD3+. (b) Células CD11c+. (c) monócitos F4/80+. (d) Células F4/80⁻. (NG) grupo não prenhe. (a-d) Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas, *p*<0.0001. Barras em cinza claro representam valores encontrados na fase de pré-implantação,

em cinza escuro na fase de implantação e em vermelho, na fase de pós-implantação.

FIGURA 11 - Determinação do percentual de linfócitos $\text{Ty}\delta\text{Ccr9}^+$. (a) Dot plot das populações de linfócitos $\text{Ty}\delta(\text{CD4}^-\text{CD8}\alpha^-\text{Ccr9}^+)$. (b) A figura mostra a variação significativa no percentual de linfócitos $\text{Ty}\delta$ que expressam o receptor Ccr9 em fêmeas não prenhes (NG) e nos diferentes dias de gestação. percentual médio de células. Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas, $p<0,0037$). Barras em cinza claro representam valores encontrados na fase de pré-implantação, em cinza escuro, na fase de implantação e em vermelho, na fase de pós-implantação.

FIGURA 12 - Expressão do receptor Ccr9 e da integrina $\alpha4\beta7^+$ em monócitos F4/80^+ . (a) Dot plot das populações de monócitos $\text{CD11b}^-\text{CD11c}^-\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$ e $\text{CD11b}^+\text{CD11c}^+\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$. (b) Análise quantitativa dessas subpopulações celulares em valores percentuais. Barras em cinza claro representam valores encontrados para monócitos $\text{CD11b}^+\text{CD11c}^+\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$; em vermelho, monócitos $\text{CD11b}^-\text{CD11c}^-\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$. Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas ($p<0,001$).

FIGURA 13 - Avaliação das populações de células dendríticas linfoides ($\text{F4/80}^-\text{CD8}\alpha^+\text{CD11c}^+\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$ e mieloides ($\text{F4/80}^-\text{CD8}\alpha^-\text{CD11c}^+\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$) por citometria de fluxo. (a) Dot plot das populações linfoides ($\text{F4/80}^-\text{CD8}\alpha^+\text{CD11c}^+\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$) e mieloides ($\text{F4/80}^-\text{CD8}\alpha^-\text{CD11c}^+\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$). (b) Análise quantitativa das subpopulações de células $\text{F4/80}^+/\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$. Barras em cinza claro representam valores encontrados para células dendríticas linfoides ($\text{CD8}\alpha^+\text{CD11c}^+\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$) e em vermelho, células dendríticas mieloides ($\text{F4/80}^-\text{CD8}\alpha^-\text{CD11c}^+\text{Ccr9}^+\alpha4\beta7^+$). Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas ($p<0,0001$).

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – alofococianina
b – blastocisto
Blast – blastocisto
BrdU – *5-Bromo-2´deoxy-uridine-Labeling*
C – quimiocina C
CC – quimiocina C-C
Ccl25 - *Chemokine (C-C) motif 25 ligand*
CCR – receptor de quimiocina C-C
Ccr9 - *C-C chemokine receptor type 9*
CD – cluster de diferenciação
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
CEEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal
cn – cone ectoplacentário
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cx3C – quimiocina C-X-C-C-C
Cx3CR - receptor de quimiocina C-X-C-C-C
CxC – quimiocina C-X-C
CxCR - receptor de quimiocina C-X-C
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
DC – células dendríticas
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DNase I - *Deoxyribonuclease I*
DP – desvio padrão
ec – cone ectoplacentário
en – endométrio
ep – epitélio uterino
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
gt – células trofoblásticas gigantes
HTF - *Human Tubal Fluid*
IDT DNA – *Integrate DNA technologies*
IL – interleucina
kD – *kilodalton*

M – molaridade

MAdCAM - molécula de adesão celular de adressina da mucosa

MCI – massa celular interna

MCP - *Monocyte chemoattractant protein*

MIPI α - *macrophage inflammatory protein alpha*

mrCcl25 – proteína Ccl25 recombinante

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

mt – células do trofoblasto mural

NF-KB – fator nuclear kapa beta

NG – não prênhe

NK – células *natural killer*

ODN - Oligodeoxinucleotídeos

PBMC – *Peripheral blood mononuclear cell*

PBS – tampão fosfato

PE – Ficoeritrina

qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa

RANTES - *Regulated upon activation and normal T- cells expressed and secreted*

RT-PCR – reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

Scr – *Scramble*

SFB – soro bovino fetal

TECK - *Thymus-Expressed-Chemokine*

tr – células trofoblásticas

Tregs – Células T regulatórias

TRITC – tetrametilrodamina

TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

VCAM – molécula de adesão vascular

xCR - receptor de quimiocina X-C

Ywhaz - *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide*

ICAM – Molécula de adesão intracelular

MHC – Complexo de histocompatibilidade

HAL – Antígeno leucocitário humano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Implantação embrionária	21
2.2 Quimiocinas na implantação embrionária	23
3 OBJETIVOS.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Animais e Ética Experimental	28
4.2 Obtenção de blastocistos (fase pré-implantacional).....	28
4.3 Obtenção de cones ectoplacentários (trofoblasto, fase de pós-implantacional)	29
4.4 Obtenção de tecido materno (endométrio)	30
4.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	31
4.6 Mapeamento da expressão gênica do fator <i>Ccl25</i> e seu receptor <i>Ccr9</i> na interface materno-fetal.....	32
4.6.1 Síntese de cDNA e Expressão Gênica.....	32
4.7 Imunolocalização de <i>Ccl25</i> e seu receptor <i>Ccr9</i> em embriões e em sítios de implantação	34
4.8 Expressão e silenciamento de <i>Ccl25</i> em células de cone ectoplacentários cultivadas.....	35
4.9 Atividade quimiotática de <i>Ccl25</i>	37
4.9.1 Delineamento experimental.....	37
4.9.2 Avaliação dos ensaios quimiotáticos	38

4.10 Efeito da quimiocina Ccl25 sobre a proliferação, morte e invasão das células trofoblásticas.....	38
4.10.1 <i>Ensaio de proliferação.....</i>	38
4.10.2 <i>Ensaio de morte celular –TUNEL</i>	39
4.10.3 <i>Ensaio de Invasão Celular – Transwell</i>	40
4.11 Expressão do receptor Ccr9 em células mononucleares do sangue periférico.....	40
4.12 Análise estatística	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Expressão diferencial de Ccl25 e seu receptor Ccr9 no compartimento materno e fetal durante a fase de implantação embrionária	42
5.2 Imunolocalização de Ccl25 e seu receptor Ccr9 na interface materno fetal	43
5.3 Silenciamento da expressão de Ccl25 por ODNs	49
5.4 Efeito quimiotático do cone ectoplacentário sobre PBMCs.....	50
5.5 Efeito do tratamento com Ccl25 sobre a proliferação, morte celular por apoptose e invasividade das células trofoblásticas	53
5.6 Análise das populações de leucócitos mononucleares em fêmeas prenhes	54
5.6.1 <i>Expressão de CD3, CD11C, F4/80 em PBMCs de fêmeas prenhes.....</i>	54
5.6.2 <i>Avaliação das subpopulações de linfócitos T</i>	55
5.6.3 <i>Avaliação das subpopulações de monócitos.....</i>	57
5.6.4 <i>Avaliação das subpopulações de células dendríticas</i>	59
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS*	72

1 INTRODUÇÃO

O processo de implantação embrionária é um evento multifuncional, que tem início com a chegada do embrião na luz uterina e sua diferenciação em blastocisto e com a formação de uma interface entre embrião e endométrio, cuja função é, suportar e controlar esse processo e o de placentação. Em camundongos, este processo envolve o contato e adesão do blastocisto com o epitélio da cripta uterina e, subsequentemente, a invasão do epitélio, sua membrana basal, da decídua e dos seus vasos pelas células trofoblásticas, que revestem o embrião (DEY et al., 2013; WANG; DEY, 2006). O mecanismo exato pelo qual o blastocisto e endométrio interagem entre si e coordenam, espacial e temporalmente, o processo de implantação embrionária não foi ainda totalmente elucidado (CHA; SUN; DEY, 2013).

Algumas etapas são essenciais para o processo de implantação do embrião e o sucesso gestacional. A ativação do blastocisto e particularmente do trofoblasto, a transformação dos fibroblastos do estroma endometrial (decidualização), a expressão de moléculas específicas pelo embrião e células deciduais, a angiogênese decidual, o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de células do sistema imunológico materno, tais como monócitos, linfócitos, células *natural killer* (NK) e células dendríticas (DC) participam das interações bioquímicas e morfológicas, coordenadas por alterações hormonais, imunológicas e por moléculas reguladoras, durante o início da gestação (ASHKAR; SANTO; CROY, 2000; DEKEL et al., 2014)

Dentre o vasto repertório de moléculas reguladoras que atuam na interface materno-fetal, especial atenção tem sido dada ao estudo de moléculas envolvidas com respostas imunológicas durante a gestação (MCMASTER; DEY; ANDREWS, 1993). Evidências recentes têm indicado um papel de alta relevância e especificidade por parte de citocinas pró- e anti-inflamatórias na interface materno-fetal, assim como um adequado balanço entre essas citocinas (CHAOUAT et al., 2004). Fazem parte da família das citocinas pró-inflamatórias, as quimiocinas, apresentando grande participação no processo de implantação embrionária (BLOIS et al., 2004). Além de seu reconhecido potencial na regulação, modulação e orientação da migração de leucócitos (EDELE et al., 2008), quimiocinas têm também sido observadas na interface materno-fetal, orientando a migração de células do sistema imunológico materno para o sítio de implantação e induzindo a migração das células trofoblásticas durante a invasão do estroma endometrial (KUANG et al., 2009).

Diferentes famílias de quimiocinas são produzidas e secretadas na interface materno-fetal, seja por células do sistema imunológico (linfócitos, NKs, monócitos e macrófagos) seja por células de origem não imunológica como as deciduais e trofoblásticas

em roedores e humanos (BOWEN et al., 2002; DENISON et al., 1998; DIMITRIADIS et al., 2005; DU; WANG; LI, 2014; ELLIOT et al., 1998; HANNAN et al., 2006; HANNAN; SALAMONSEN, 2008; KEELAN et al., 1999; LAHAM; BRENNECKE; RICE, 1999; WHITE et al., 2005). A produção desregulada dessas moléculas tem sido associada a patologias gestacionais (BRIANA et al., 2007). Estudos prévios realizados em nosso laboratório indicaram a expressão de determinadas quimiocinas em células trofoblásticas de camundongos em fase pós-implantacional (HOSHIDA et al., 2007). O perfil de expressão gênica das células trofoblásticas do cone ectoplacentário durante o período pós-implantação demonstrou um aumento significativo na abundância dos transcritos de *Ccl25* nestas células (HOSHIDA et al., 2007). Estes resultados sugerem um possível papel de *Ccl25* nessa fase da gestação.

A quimiocina *Ccl25* pertencente a família de quimiocinas CC, com duas cisteínas adjacentes em sua estrutura proteína, responsáveis pela atividade quimiotáticas da quimiocina. *Ccl25* é capaz de atrair diferentes populações de linfócitos e monócitos. Foi primeiramente descrita no timo e intestino. Nesses sítios, ao se ligar ao seu receptor *Ccr9*, promove a ativação e migração de timócitos (RIVERA-NIEVES et al., 2006). A co-localização de *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* em populações de células $CD4^+CD8^+$ e $CD4^+CD8^-$, parece estimular fortemente o potencial adesivo destas células via interação com moléculas de adesão vascular, facilitando o tráfego destas populações para os tecidos (PARMO-CABAÑAS et al., 2007). A migração de células *Ccr9*⁺ em processos inflamatórios no intestino é altamente regulado por *Ccl25*. Evidências recentes demonstram que a secreção de *Ccl25* pelo epitélio intestinal é a principal via de controle da migração de células T intra-epiteliais (células $T\alpha\beta$ e $T\gamma\delta$) e de algumas populações de células T regulatórias (Tregs), via a integrina CD103 (CAMPBELL; BUTCHER, 2002; ERICSSON et al., 2004; LEHMANN et al., 2002). A ligação *Ccl25*-*Ccr9* induz a adesão de células $T\gamma\delta$ via CD103 a E-caderina (*Epithelial Cadherin*), mantendo estas células imóveis na camada epitelial do intestino. Quando deletada, a sequência que codifica o receptor *Ccr9* e a integrina, em camundongos existe uma redução na populações de células células $T\alpha\beta$ e $T\gamma\delta$ intraepiteliais e Tregs nos tecidos (ERICSSON; ARYA; AGACE, 2004; WURBEL et al., 2001). Um dos eventos reguladores mais importantes, do qual as quimiocinas participam é a regulação da tolerância imunológica (FERNEKORN; KRUSE, 2005). É possível que durante a gestação o tráfego de diferentes populações de leucócitos para o sítio de implantação, além de estimular a migração das células trofoblásticas possa também estar associado a formação de um ambiente propício e tolerogênico para o sucesso gestacional. Neste contexto, este estudo se propos a investigar a expressão de *Ccl25* e seu receptor ao longo do período implantacional e possíveis ações dessa molécula sobre o trofoblasto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Implantação embrionária

O alojamento do embrião no endométrio, processo conhecido como implantação embrionária, se inicia com a formação e ativação do blastocisto aos 3,5 dias de gestação, com o preparo do endométrio durante o período estral e a subsequente aposição, adesão e invasão do estroma endometrial pelo blastocisto (SONG; HAN; LIM et al., 2007). O blastocisto é formado externamente pelo trofotoderma (células trofoblásticas) e internamente pela massa celular interna (MCI), endoderma primitivo e cavidade blastocística (HU; CROSS, 2010). As células trofoblásticas em contato com a MCI formam o trofoblasto polar e as demais, o trofoblasto mural. Para iniciar o processo de implantação, o embrião se posiciona em criptas uterinas e inicia sua aproximação com o endométrio através da sua região abembrionária, na região antimesometrial uterina (AMOROSO, 1955; ROUGH, 1968). Acredita-se que para este posicionamento, entre outros fatores, ocorra também a participação de gradiente específico de quimiocinas liberadas no ambiente uterino (RED-HORSE et al., 2004).

O contato do embrião com o epitélio ocorre, em parte, devido ao crescimento do blastocisto e o fechamento da luz uterina, promovido pela progesterona. A perda da zona pelúcida (processo bioquímico que envolve ação enzimática derivada do trofoblasto) permite o contato direto do trofoblasto com o epitélio uterino e o início dos eventos relacionados ao processo de implantação embrionária (POTTS, 1968; YOSHINAGA, 2013). Subsequentemente, alterações na modulação da expressão de inúmeras moléculas, em ambas as superfícies, trofoblasto e epitélio uterino, possibilitam a adesão entre e a interação entre embrião e endométrio. Particularmente importantes para essa interação têm sido a participação das moléculas como o proteoglicano heparan sulfato, a molécula de adesão celular L-selectina e tropinina, produzidas pelo trofoblasto (YOSHINAGA, 2010). Na porção materna, inúmeras moléculas de adesão são moduladas com a chegada do blastocisto na cripta uterina. Caderinas, tropinina, MADCAM-1 e a glicoproteína de superfície celular CD44, são exemplos de moléculas de adesão com expressão aumentada durante o preparo do endométrio para o processo de implantação (YIP et al., 2013).

Nesta fase, aproximadamente no dia 4,5 de gestação, o endométrio está sofrendo intenso rearranjo celular e funcional para formar uma estrutura de particular importância, a decídua (reação decidual), que mais tarde originará a porção materna da placenta (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993; PIJNENBORG; VERCRUYSSSE, 2006). Neste processo,

fibroblastos endometriais proliferam, sofrem um processo de transformação e adquirem um fenótipo epitelióide e secretor (ABRAHAMSOHN; ZORN; OLIVEIRA, 2002). Este processo é dependente de hormônios esteróides (principalmente a progesterona), além de outros hormônios, citocinas, quimiocinas e moléculas de regulação do metabolismo celular dessas células (RIBEIRO, 2011). O início do processo de invasão do estroma endometrial pelo trofoblasto, caracteriza não somente o ancoramento definitivo do embrião no endométrio, mas também o início da formação de uma placentação do tipo hemocorial, em que o trofoblasto, após vencer barreiras representadas pelo epitélio e estroma uterino faz contato direto com o sangue materno (AIN; CANHAM; SOARES, 2003; CROSS et al., 2002; MOSSMAN, 1937; SHARKEY; SMITH, 2003).

O contato do trofoblasto mural com o epitélio uterino na região antimesometrial desencadeia uma onda de diferenciação nestas células que culminam com a formação das células trofoblásticas gigantes parietais ou murais, com intensa atividade invasiva e fagocitária. Estas células invadem o epitélio uterino, sua membrana basal e a decídua recém formada até alcançar a vascularização capilar subepitelial (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1989). Células trofoblásticas gigantes substituem células endoteliais na parede destes vasos, estabelecendo precocemente uma superfície de trocas entre o sangue materno e a superfície destas células na região mural embrionária.

No 6o dia de gestação, as células do trofoblasto polar proliferam intensamente e formam uma excrescência denominada de cone ectoplacentário. Na periferia deste aglomerado celular, diferenciam-se células trofoblásticas gigantes secundárias com potencial funcional semelhante ao das células gigantes do trofoblasto mural e, que contribuem para a implantação embrionária na região mesometrial (MÜNTENER; HSU, 1977). Estas células, invasivas e fagocíticas, revestem uma compacta camada de células de atividade proliferativa, que a partir do 8º dia de gestação participam da formação da placenta (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1989; CROSS; WEBB; FISCHER., 1994; SIMMONS; CROSS, 2005).

Iniciando durante o processo de implantação embrionária e se estendendo ao longo de toda a gestação, células do sistema imunológico materno povoam regiões específicas do estroma endometrial e participam da modulação de repostas inflamatórias (Th1) e anti-inflamatórias (Th2) (CROY et al., 2012; ZENCLUSSEN, 2005). Atividades reguladoras têm sido atribuídas a essas citocinas seja na defesa contra patógenos, seja no estabelecimento de um microambiente tolerogênico ao embrião (ZARNANI et al., 2007). Células linfocitárias T reguladoras, células dendríticas e macrófagos produzem citocinas e quimiocinas modulando as condições adequadas e necessárias para o sucesso gestacional (ALUVIHARE et al., 2004, 2005; BLOIS et al., 2007; CHAOUAT; DUBANCHET; LEDÉE, 2007; CLARK, 2005; FRACCAROLI et al., 2009; TERNESS et

al., 2007; ZENCLUSSEN et al., 2001).

2.2 Quimiocinas na implantação embrionária

Quimiocinas são pequenas citocinas pró-inflamatórias que apresentam estrutura polipeptídica de 6 a 15 kDa, com duas alças dissulfeto e podem ser classificadas de acordo com o número e a localização dos resíduos de cisteína na região N-terminal: CC, CxC, C ou Cx3C (BOWEN et al., 2002; MOSER; WOLF; WALTZ, 2004). Estas moléculas desempenham papéis específicos em vários processos celulares e em diferentes sistemas biológicos. As quimiocinas foram primeiramente estudadas por estimular respostas inflamatórias, maturação e migração de células do sistema imunológico. Como fatores quimiotáticos para leucócitos, podem ser também produzidas por diferentes tecidos, atuando na homeostase tecidual (BORRONI et al., 2008). Diversas populações celulares tais como células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos são capazes de produzir diferentes famílias de quimicinas (LUSTER, 1998; ZHOU et al., 2005). As quimiocinas também têm grande habilidade para se ligar a proteoglicanos e moléculas da matriz extracelular, como o heparan sulfato, controlando a movimentação celular e estimulando a mobilidade dos leucócitos e células apresentadoras de antígenos em tecidos-alvos (BAGGIOLINI; DEWALB; MOSER, 1994; HEDRICK; ZLOTNIK, 1996; SCHALL; BACON, 1994; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000). Os receptores de quimiocinas (CCR, CxCR, xCR e Cx3CR) são expressos principalmente em leucócitos e sua estrutura possui sete domínios transmembrana em alfa-hélice, os quais se ligam a uma proteína G intracelular, ativando a polimerização de suas subunidades e consequentemente o desencadeamento de cascatas de sinalização na célula-alvo (MOSER; WOLF; WALTZ, 2004).

Quimiocinas foram também detectadas em células de atividade imunológica como as células T, *natural killer* (NK), monócitos/macrófagos, células dendríticas e, ainda, em células não imunológicas, como as células do epitélio uterino (DIMITRIADIS et al., 2005, 2010; HICKEY; FAHEY; CHARLES, 2013), placenta (DENISON et al., 1998; ELLIOT et al., 1998; TEOH et al., 2014), decídua (CAO et al., 2013; DENISON et al., 1998), membranas embrionárias (KEELAN et al., 1999, LAHAM et al., 1999) e trofoblasto invasivo (BOWEN et al., 2002; HANNAN et al., 2006; HANNAN; SALAMONSEN, 2008; KUANG et al., 2009).

Em humanos, a expressão de determinadas quimiocinas no sistema reprodutor feminino está correlacionada a processos de ovulação, menstruação, decidualização e implantação embrionária (JONES et al., 2004), enquanto que a expressão desbalanceada destas moléculas tem sido considerada um fator relevante para a instalação de patologias gestacionais (BOWEN et al., 2002). De especial importância, são os estudos que

mostram que cicatrizes endometriais, provenientes de partos cirúrgicos anteriores, são focos de inflamação e se tornam sítios atrativos para a implantação, provavelmente devido à secreção de quimiocinas e outras moléculas quimiotáticas (DOMINGUEZ et al., 2005).

Evidências experimentais também sugerem que as quimiocinas guiam o blastocisto ao local da implantação embrionária, por meio da indução de expressão de moléculas de adesão nas superfícies do epitélio uterino e do trofoblasto (HANNAN et al., 2006). No endométrio humano, uma gama de quimiocinas são produzidas (Cx3CL1, CCL7, CCL14, CCL4) enquanto seus respectivos receptores prevalecem no trofoblasto (CCR1, CCR3 e Cx3CR1) (HANNAN et al., 2006), sugerindo um importante envolvimento destas moléculas nas interações materno-fetais. À quimiocina Cxcl14 foi atribuída a função de controle do tráfego, maturação e diferenciação de células NK uterinas (CAO et al., 2013).

Além disso, estudos prévios evidenciaram a secreção de quimiocinas e moléculas quimiotáticas no compartimento uterino de camundongos. MCP-1, MIP1 α e RANTES, são produzidas no endométrio e sua expressão é controlada através da indução de IL-1, em resposta aos níveis de estrógeno e progesterona (WOOD; HAUSMANN; KANAKARAJ, 1999). Cxcl14, Cxcl15, Ccl17, Ccl19, Ccl21a, Ccl21b são todos exemplos de quimiocinas, cuja expressão gênica encontra-se aumentada no endométrio, durante o início do processo de implantação embrionária (YIP et al., 2013). As quimiocinas MCP (*monocyte chemoattractant protein*) e RANTES (*Regulated upon activation and normal T- cells expressed and secreted*) pertencem à família CC e, apresentam a função primordial de ativar monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos. A MCP-1 e MCP-2 estão presentes na decídua e na placenta ao longo da gestação, contudo, apenas na placenta a síntese de MCP-1 apresenta aumento gradual até o final do período gestacional. RANTES é secretada pelo cório, decídua e placenta e está presente no fluido amniótico, principalmente no terceiro trimestre da gestação (BOWEN et al., 2002; DIMITRIADIS et al., 2005; SHIMOYA et al., 1998). Adicionalmente, IL-8, MCP-1 e RANTES foram detectadas nos tecidos uterinos durante o ciclo reprodutivo. IL-8 e MCP-1 estão localizadas nos epitélios luminal e glandular, enquanto a localização de RANTES é mais proeminente no estroma endometrial. Especialmente IL-8, tem grande atividade na capacidade invasiva e migratória das células do trofoblasto (DOMINGUEZ et al., 2003; JOVANOVIC et al., 2010). A quimiocina CCL25 (*Chemokine (C-C motif) ligand 25*) ou TECK (*Thymus-Expressed-Chemokine*) pertence a família de quimiocinas CC. Diferente das demais, suas duas cisteínas terminais não apresentam um resíduo de tirosina entre elas, mas duas casas acima das cisteínas, na cadeia de proteína. Este resíduo de tirosina é o principal elemento na atração de monócitos ativados. Outra diferença essencial é a localização de seu gene no cromossomo 8, enquanto que o da maioria das quimiocinas CC, está no cromossomo 11

(VICARI et al., 1997). Apesar da estrutura primária de CCL25 ser diferente, ela apresenta receptor e funções biológicas semelhantes as demais quimiocinas (VICARI et al., 1997). Sua expressão é alta no epitélio tímico, nas células dendríticas do timo e no epitélio intestinal (WILKINSON; OWEN; JENKINSON, 1999). Seu receptor CCR9, apresenta 369 aminoácidos em sua estrutura, possui sete domínios transmembrana acoplados a uma proteína G, como os demais receptores da família CC e, é expresso principalmente em células T CD4⁺CD8⁻ (CD, *Cluster of differentiation*), células T CD4⁺CD8⁺ imaturas, assim como em células T CD4⁺ e células CD8⁺ (ZABALLOS et al., 1999). A expressão de CCL25/CCR9 está associada a migração e ativação dessas células imunológicas (RIVERA-NIEVES et al., 2006; WURBEL et al., 2011). Um papel para CCL25 na retenção/migração de células T no cortex tímico, via receptor CCR9 (mobilização de cálcio e ativação da via de NF-KB), até que sua maturação esteja completa, também tem sido amplamente cogitada (AIFANTIS et al., 2001; CAMPBELL; PAN; BUTCHER, 1999; NORMENT et al., 2000). O receptor CCR9 também está presente na superfície celular de timócitos TCR $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$, responsivos a Ccl25. Nestas células, a ligação de um antígeno ao receptor TCR aumenta a resposta a CCL25. Esses dados sugerem um papel essencial de CCL25 na maturação desta população celular T (UEHARA; FARBER; LOVE, 2002). Populações de células produtoras de anticorpos, também são alvo da interação CCL25-CCR9. Esta população de células responde quimiotaticamente a CCL25, e dependendo da interação e do microambiente aonde estão inseridas, apresentam expressão diferencial de anticorpos (BOWMAN et al., 2002).

A migração de linfócitos CCR9⁺ para o intestino delgado tem sido considerada um efeito da ação quimiotática de CCL25, também observada em tumores e na migração de células tronco. O mecanismo de metástase do melanoma no intestino delgado utiliza a via CCR9-CCL25 juntamente com integrinas específicas ($\alpha 4\beta 1$, PARMO-CABAÑAS et al., 2007). A expressão funcional do receptor CCR9 em células de melanoma facilita consideravelmente a metástase deste tumor no intestino delgado (AMERSI et al., 2008). Também foi identificada a ação de algumas quimiocinas, e dentre elas também a CCL25, na indução da migração de células progenitoras de perióstio e de células tronco mesenquimais, o que também se correlacionou com a superexpressão de genes relacionados à movimentação celular, polaridade e reorganização de membrana e de citoesqueleto (BINGER et al., 2008).

Um leucócito ativado por quimiocinas deve expressar integrinas em superfície que lhe permita mediar o rolamento por sobre a superfície endotelial, aumentar a estabilidade dessas ligações e direcionar sua passagens por diapedese, por entre as células endoteliais por meio do acoplamento com moléculas específicas de adesão. Importante ressaltar a

possibilidade de mudanças na especificidade de ligação a integrinas nos diferentes tipos de ligação quimiocina-receptor, indicando um mecanismo de especificidade de seleção de linfócitos do sangue periférico, durante o *homing*, por meio da ativação de integrinas específicas, por diferentes quimiocinas. (ALTEVOGT et al., 1995; COSTA et al., 2012; PIALI et al., 1995)

No caso da ligação de CCL25 ao receptor CCR9, a ativação do leucócito e que permite sua adesão/interação com o endotélio para posterior migração para os tecidos ocorre via $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1 (*Mucosal Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1*) ou via $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 (*Vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1*). A ligação de CCL25 a CCR9 estimula a desfosforilação da cadeia $\beta 7$ da integrina, expondo a forma ativa da integrina $\alpha 4\beta 7$, o que aumenta sua afinidade por MAdCAM-1 (Figura 1) (PALS; GORTER; SPAARGAREN, 2007; PARMO-CABANÃS et al., 2007; SUN et al., 2014).

No contexto das funções exercidas pela quimiocina CCL25 até o momento, o estudo de sua expressão pelas células trofoblásticas pode mostrar novas perspectivas de sinalização para o recrutamento de linfócitos específicos envolvidos com a resposta imunológica na interface materno-placentária e/ou mecanismos facilitadores da atividade invasiva do trofoblasto durante o processo de implantação embrionária.

Figura 1: Esquema demonstrando a interação de leucócitos com as moléculas de superfície celular do endotélio para sua migração para os tecidos. A interação da molécula de adesão MAdCAM com a integrina $\alpha 4\beta 7$ após a ativação do leucócito por meio da ligação específica de CCL25 com seu receptor CCR9. Esta ligação ativam a apresentação de integrinas $\alpha 4\beta 7$ na superfície celular do endotélio, aumentando a estabilidade das ligações e possibilitando a passagem a do leucócito para os tecidos. Modificado de (AGACE, 2006)

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi caracterizar a expressão da quimiocina *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* durante o processo de implantação embrionária em camundongos. Para isto, foi idealizado o seguinte desenho experimental:

- Avaliação da expressão gênica de *Ccl25/Ccr9* durante o processo de implantação embrionária.
- Imunolocalização dos tipos celulares que expressam a quimiocina *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* na interface materno fetal.
- Identificação de um possível efeito biológico de *Ccl25* recombinante sobre as células trofoblásticas e mononucleares do sangue periférico.
- Avaliação do efeito do silenciamento de *Ccl25* em células trofoblásticas sobre a migração de células mononucleares utilizando ensaios de quimiotaxia.
- Análise das populações de células mononucleares do sangue periférico que expressam o receptor *Ccr9* em sua superfície celular durante o início do processo de implantação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e Ética Experimental

Todo o procedimento experimental foi realizado seguindo as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi autorizado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foram utilizados camundongos da linhagem CD-1 com cerca de 2 meses de idade, mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob regime *ad libitum* de água e ração granulada, com enriquecimento ambiental nas gaiolas. O desenho experimental utilizado neste projeto postulou a utilização de triplicatas de amostras em múltiplos animais doadores de células e tecidos, desta forma ao menos uma triplicata de amostras foi obtida de pelo menos três animais diferentes para cada experimento. Foram utilizados um total de 117 animais fêmeas durante todo período de trabalho, divididos entre os diversos grupos experimentais.

4.2 Obtenção de blastocistos (fase pré-implantacional)

Para a obtenção de blastocistos expandidos, os camundongos fêmeas foram acasalados com machos entre as 17 horas (h) e as 8 h da manhã seguinte, com a confirmação do *plug* vaginal nas fêmeas que acasalaram (dia 0,5 de gestação). As fêmeas prênes foram, então, humanamente sacrificadas por deslocamento cervical nos dias 3,5, 4,5 e 5,5 de gestação (dg). Os cornos uterinos foram acessados por corte em “V” na parede do abdômen, coletados e lavados em placa de Petri (100 mm, TPP, Zollstrasse, Swi) contendo tampão fosfato 0,1%, pH 7,4 (PBS; *Phosphate Saline Buffer 0.1M*, Sigma, MO, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Life Technologies, CA, USA) a 37 °C. Para a obtenção do lavado uterino (*flushing*) e, por conseguinte, dos blastocistos, os cornos uterinos foram separados, com um corte logo acima da cérvix e lavados internamente sobre uma placa de Petri (60 mm, TPP, Swi) com PBS acrescido de 20% SFB a 37 °C, com o auxílio de uma seringa de 1 mL (BD Biosciences, CA, USA) inserida diretamente na luz uterina.

Para a obtenção de blastocisitos no dia 5,5 dg, procedimento similar foi realizado. No entanto, foram necessárias repetidas lavagens, uma vez que neste momento os embriões estão fortemente aderidos ao endométrio. Os blastocistos foram separados com auxílio de um capilar de vidro estéril, com a ponta estirada e um sistema de sucção de boca, sobre

observação em estereomicroscópio (Discovery StereoV8, Zeiss, Germany). Blastocistos utilizados para os experimentos de cultura celular foram lavados com PBS contendo 20% SFB a 37 °C e agrupados em placas de Petri (35 mm, TPP, Swi) contendo gotas de 100 µL de meio de cultura para embriões HTF (*Human Tubal Fluid*, Life Global, USA) suplementado com 10 % SFB. Todas as gotas foram cobertas com 5 mL de óleo mineral (Sigma, MO, USA) e mantidas por 1 h em incubadora a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂.

Blastocistos utilizados para extração de RNA e síntese de cDNA foram lavados três vezes em PBS estéril a 0,1% a temperatura ambiente, antes de serem transferidos ($n=5$; triplicata) para um tubo estéril de 0,2 mL (AxygenBioScience Inc., CA, USA) contendo 49,5 µL de solução de lise para extração de RNA acrescido de 0,5 µL de DNase I (*Power Syber Green Cell-to-Ct kit*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os blastocistos foram transferidos com o menor volume de PBS possível para evitar a diluição da solução de lise do kit.

Blastocistos que foram utilizados para reações de imunofluorescência, após o *flushing*, foram lavados três vezes em PBS a temperatura ambiente e fixados imediatamente em 1 mL de metanol (Labsynth, SP, BR) a -20 °C (10 minutos) em uma placa escavada de vidro. Em seguida, os blastocistos foram lavados novamente por três vezes em PBS, em uma segunda placa de vidro escavada e, utilizados imediatamente. Apenas embriões com a morfologia das células trofoblásticas (trophoblaste) e da massa celular interna (células tronco embrionárias/embrioblasto) adequadas ao dia de gestação foram utilizados nestes experimentos.

4.3 Obtenção de cones ectoplacentários (trofoblasto, fase de pós-implantacional)

Fêmeas prenhes aos 7,5 dias de gestação foram sacrificadas por deslocamento cervical, seus úteros com os sítios de implantação removidos e imediatamente colocados em uma placa de Petri estéril (60 mm, TPP) com 4 mL de solução estéril de PBS 0,1 M com 20 % de SFB e antibióticos (100 µg/mL estreptomicina, 10 µL/mL gentamicina; Cultilab, SP, BR), a 37 °C. A coleta de cones ectoplacentários foi realizada conforme protocolo estabelecido em nosso laboratório (HOSHIDA et al., 2007). Os sítios de implantação foram dissecados um a um após completa remoção do miométrio e mantidos em PBS suplementado a 37 °C sobre placa aquecida. Os sítios de implantação com a decídua exposta, foram cortados ao meio com auxílio de uma pinça estéril e uma seringa de insulina de 1 mL vazia (BD, Biosciences) em estereomicroscópio (Discovery Stereo V8, Zeiss) para a visualização do cone ectoplacentário. Com o auxílio da pinça e da ponta da agulha da seringa, os cones foram retirados cuidadosamente da decídua e separados em uma placa de Petri (35mm, TPP)

contendo PBS suplementado e mantida sobre placa aquecida a 37 °C. Após a rápida coleta dos cones, tomando-se o cuidado para que não fossem danificados e que estivessem livres de fragmentos deciduais associados, todos foram lavados por três vezes com PBS suplementado a 37 °C em fluxo laminar. Em seguida, os cones ectoplacentários foram divididos ($n=5$; triplicatas) em poços individuais, em placas de 24 poços (TPP, Swi), sobre uma lamínula de vidro estéril de 13 mm de diâmetro, previamente cobertas com SFB e secas em incubadora por 15 minutos, para facilitar a posterior adesão celular. Foram, então, recobertas por 500 µL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Sigma, USA) suplementado com insulina (10 µg/mL, Gibco^R, Life Technologies, CA, USA), antibióticos (100 µg/mL estreptomicina, 10 µL/mL gentamicina, 10 µg/mL amphotericina; Cultilab, SP, BR), *Mito+ Serum Extender* (0,2 ng/mL, Becton Dickinson Lab, MA, USA), 20% FBS, a 37 °C e mantidos em incubadora a 5% de CO₂. As placas contendo os cones em cultura foram mantidas por 12 h em incubadora para a total adesão das células trofoblásticas às lamínulas e início dos experimentos de quimiotaxia e silenciamento gênico.

Cones ectoplacentários que foram destinados a extração de RNA e síntese de cDNA, foram lavados imediatamente após dissecados em PBS estéril a 4 °C por três vezes em placas de Petri (35mm) antes de transferidos ($n=3$; triplicatas) com o menor volume possível para tubos de 0,2 mL (AxygenBioScience Inc., USA) contendo 49,5 µL de solução de lise acrescidos de 0,5 µL de DNase I (*Power Syber GreenCell-to-Ct kit* Applied Biosystems) e processados imediatamente.

4.4 Obtenção de tecido materno (endométrio)

Os embriões de 3,5, 4,5, 5,5 e 7,5 dias de gestação foram obtidos conforme detalhado anteriormente. Nos dias 3,5, 4,5 e 5,5 de gestação, após a coleta dos embriões, os cornos uterinos foram abertos longitudinalmente e raspados internamente com auxílio de uma agulha da seringa de insulina (BD Bioscience, USA) para o descolamento do endométrio (fragmentos contendo epitélio uterino e estroma endometrial com células deciduais, glândulas, vasos e células do sistema imunológico). Imediatamente após a raspagem, os fragmentos foram colocados em tubos de 0,2 mL contendo 49,5 µL de solução de lise e 0,5 µL de DNase I. Para os embriões aos 7,5 dias de gestação, após a coleta do cone ectoplacentário, foram coletados fragmentos da decídua mesometrial. Estes também foram transferidos para tubo de 0,2 mL contendo 49,5 µL de solução de lise e 0,5 µL DNase I.

4.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

O sangue periférico de fêmeas prenhes nos dias 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 e 7,5dg e de fêmeas não prenhes foi coletado para realização de ensaios de Citometria de fluxo e de Quimiotaxia. Utilizou-se um total de 21 fêmeas para estes procedimentos (6 não prenhes, e 3 de cada um dos dias de gestação citados acima).

Para esses procedimentos, os animais foram previamente anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução de Ketamina (1,5 mL Cloridrato de Cetamina 10 %, Agener União Saúde Animal, DF, BR) e Xilazina (0,5 mL Xilazina 2%, Agener) diluídas em água destilada e, administrada na proporção de 0,1 mL/10g de peso corporal. Após a confirmação da falta do ato reflexo a dor, o animal foi mantido de cabeça para baixo e o globo ocular foi retirado para o gotejamento do sangue da artéria ocular. Após a coleta do volume desejado em tubos heparinizados (BD Vacutainer, NJ, USA), o animal era imediatamente sacrificado por deslocamento cervical. O sangue total coletado foi imediatamente diluído em 1 mL de PBS estéril a temperatura ambiente e homogeneizado. Em seguida, o sangue foi despejado com cuidado sobre a parede lateral de um tubo de fundo cônico (Corning, NY, USA) de 15 mL contendo 1 mL de Ficoll, meio para separação de células por densidade (*Ficoll-Paque*, GE, Uppsala, SE), a temperatura ambiente.

As amostras foram colhidas em triplicatas e imediatamente levadas a centrifugação (5804R, Eppendorf, Germany) a 1.800 rpm por 30 minutos, a 4 °C para a separação de mononucleares do sangue periférico (PBMCs; *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), que sedimentam sob a forma de um anél esbraquiçado. Esta camada de células foi então succionada com uma pipeta de 1 mL, evitando-se a contaminação com as hemácias acumuladas no fundo do tubo. O volume total de PBMCs obtido foi diluído 1:1 (v/v) em meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com antibióticos (100 µg/mL estreptomicina, 10 µL/mL gentamicina; ambos da Cultilab, SP, BR) e 10% SFB e centrifugado por 10 minutos, a 1.800 rpm, a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* dissolvido em 5 mL de meio DMEM suplementado e submetido a nova centrifugação. Por fim, o sobrenadante foi removido, e as células ressuspensas em 1 mL de meio DMEM suplementado. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi diluída em 10 µL de 0,4 % de *Trypan blue* (*trypan blue staining solution*) e imediatamente contadas (*Cell counter*, Countess Automated Cell Counter, Invitrogen, CA, USA) para que o número de células por mililitro fosse determinado.

As amostras de PBMC utilizadas para a extração de RNA foram separadas em triplicatas, em concentrações de 1×10^4 células/mL e centrifugadas três vezes em 1 mL de PBS estéril por 10 minutos a 1.800 rpm a 4 °C. As células foram então ressuspensas em 49,5 µL de solução de lise e 0,5 µL DNase I e transferidas para um tubo de 0,2 mL e mantidas em gelo para uso imediato.

. Para ensaios de citometria de fluxo, lotes de 1×10^6 PBMCs/mL, obtidos como previamente detalhado, foram diluídos em 1 mL de solução de criopreservação (90 % de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha) em criotubo (Costar, Cambridge, MA, EUA) sobre gelo e, imediatamente colocados em um suporte de tubos contendo isopropanol (Merck) sobre gelo seco. Após o congelamento, as amostras foram mantidas a -80°C até o momento de uso. Para os ensaios, as células foram descongeladas rapidamente com a adição de 2 mL de meio DMEM suplementado ao criotubo, a temperatura ambiente, seguido por centrifugações sucessivas a 1.800 rpm, por 10 min, a 4°C e, lavagens com meio DMEM. As células foram então contadas, separadas em lotes de 5×10^5 células/mL, lavadas em PBS estéril e fixadas em 1 mL de metanol (Labsynth, SP, BR) a -20°C , por 10 minutos. Para a remoção do fixador, as células foram lavadas e centrifugadas em 1 mL de PBS estéril, aonde permaneceram por poucos minutos até o início dos ensaios de citometria de fluxo.

4.6 Mapeamento da expressão gênica do fator *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* na interface materno-fetal

A expressão gênica de *Ccl25* e de seu receptor *Ccr9* foi mapeada no compartimento embrionário nas fases de pré-implantação (blastocistos expandidos obtidos aos 3,5, 4,5 e 5,5 dg), de pós-implantação (cone ectoplacentário aos 7,5 dg), no compartimento materno em fragmentos de endométrio de camundongas prenhes aos 3,5, 4,5 e 5,5 dg e da decídua mesometrial no dia 7,5 de gestação. A expressão do receptor *Ccr9* também foi mapeada em linfócitos isolados do sangue periférico nos dias 3,5, 4,5, 5,5 e 7,5 de gestação.

4.6.1 Síntese de cDNA e Expressão Gênica

A menos que especificado as soluções abaixo mencionadas pertenciam ao Kit Power Syber Green Cell-to-Ct, obtido da Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Como descrito anteriormente, os blastocistos, cones ectoplacentários, PBMCs e fragmentos de endométrio e de decídua, em triplicatas, foram previamente lavados em PBS e transferidos para tubos de 0,2 mL contendo 50 μL de solução de lise, a temperatura ambiente. Cada uma das amostras foi homogeneizada imediatamente após sua transferência para a solução de lise, com uma pipeta de 25 μL , por 1 minuto, e na sequência, deixada descansar no termociclador (*Master Cycler Eppgradient S*, Eppendorf, Germany) por 5 min, a 26°C . A reação de lise foi neutralizada com 5 μL de solução *Stop* por 2 minutos, a temperatura ambiente. Cada reação de lise produz um total de 55 μL de lisado total que foi

imediatamente colocado em gelo e dos quais, uma aliquota de 15 µL foi utilizada para a reação de transcriptase reversa (RT) e síntese de DNA complementar (cDNA; conforme sugestão do fabricante). A reação de síntese do cDNA foi realizada adicionando-se 15 µL de lisado a um tubo estéril de 0,2 mL (Axygen BioScience Inc., USA) contendo 25 µL de 2X Syber RT buffer, 2,5 µL da enzima RT (20X) e 8,5 µL de água ultra pura, para um volume total de reação de 50 µL. Cada amostra foi levada ao termociclador (Eppendorf) para um ciclo programado de 60 minutos a 37 °C, 5 minutos a 95 °C e 4 °C no final da reação. As amostras tiveram sua concentração mensurada, assim como seus valores de absorbância (NanoVue, GE, Cambridge, UK), para determinar a qualidade do cDNA produzido. As amostras foram sempre mantidas em gelo enquanto em experimento.

Para realização das reações de PCR em tempo real, foram sintetizados pares de *primers* para *Ccl25*, *Ccr9* e para *YWHAZ* utilizado como controle endógeno (Tabela 1; IDT DNA Technologies, IA, USA). Após quantificadas as amostras de cDNA, utilizou-se um volume de 1 µL de cDNA para cada reação de PCR em um volume final de reação de 20 µL. Em placas estéreis de 96 poços (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), foi adicionado 1 µL de cDNA, 10 µL de PCR master Mix, 0,5 µL de *primer sense*, 0,5 µL de *primer antisense* (diluídos em água ultra pura) e 8 µL de água ultra pura. Foram utilizadas amostras em triplicata. A placa foi imediatamente selada com uma película plástica e o ciclo de PCR em tempo real programado da seguinte forma: 10 minutos a 95 °C seguidos por 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto no equipamento *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

Complementar à leitura da expressão gênica, foi realizada a curva de dissociação de produto específico (*Melt curve*, 40 ciclos/60 segundos/72 °C), que determina a amplificação de um produto específico (gene alvo) ou inespecífico, como dímeros de *primers*. Amostras com mais de um pico na curva foram descartadas.

Primer	Sense	Antisense
<i>Ccl25</i>	CTCAGGACCAGAAAGGCATTG	CTCAGGACCAGAAAGGCATTG
<i>Ccr9</i>	ATGCCACAGAACTCACAAGCC	TGCCCAAGGTGCCCACAATG
<i>YWhaz</i>	GAAGCCACAATGTTCTTGGCCCAT	AAACCAACAGAGACTTGAAGCAC

TABELA 1 - *Primers* (IDT DNATechnologies, USA) desenhados para os experimentos de qPCR em tempo real. *Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 25 (Ccl25)*, transcript variant 1, mRNA; Reference Sequence: NM_009138.3; *Mus musculus chemokine (C-C motif) receptor 9 (Ccr9)*, transcript variant 1, mRNA; NCBI Reference Sequence: NM_001166625.1; *Mus musculus tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (Ywhaz)*, transcript variant 1, mRNA; Reference Sequence: NM_011740.3.

Cada amostra foi montada na placa de forma que: cada triplicata de uma amostra do gene alvo, teve uma triplicata em espelho avaliada para o gene endógeno (*YWHAZ*; controle). Um controle negativo foi acrescido a cada grupo de mix de reação, acrescidos dos *primers* (*Ccl25* ou *Ccr9* ou *YWHAZ*), água ultra pura, porém sem os cDNAs das amostras. Os dados da leitura das reações foi realizado no software StepOne Software v2.0.2 Patch (Applied Biosystems, USA). Os valores médios de cada triplicata incluída na análise de dados foi submetida ao método de avaliação delta-delta-ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$), que compara os grupos de estudo, levando em consideração os valores de expressão do gene endógeno (controle) vs. os valores do gene alvo, para cada uma das amostras.

4.7 Imunolocalização de *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* em embriões e em sítios de implantação

A presença da proteína *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* nas células trofoblásticas e no estroma endometrial foi investigada por meio de reações de imunofluorescência em cortes de congelamento dos sítios de implantação e em blastocistos recém obtidos e fixados. Como descrito anteriormente, os blastocistos foram coletados por lavagem da da tuba uterina/corno uterino (aos 4,5 e 5,5 dias de gestação), fixados em metanol (Labsynth) a -20 °C 10 minutos e lavados em PBS 0,1 M em uma placa de vidro escavada.

Os sítios de implantação (4,5, 5,5 e 7,5 dias de gestação) dissecados do corno uterino foram lavados em PBS, a temperatura ambiente, incluídos em meio crioprotetor *TissueTeck* (*O.C.T Compound*; Sakura Finetek Europe, NL) e imediatamente imersos em álcool isopentano (Merck, Darmstadt, Alemanha) a -20 °C, em uma placa de vidro escavada, que foi inserida em gelo seco. Após 30 segundos de exposição, os sítios foram transferidos para nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C até o momento de uso. Cortes de 8 µm de espessura foram obtidos em criostato (Leica CM 1900; Leica Microsystems, Nussloch, Germany) e aderidos à lâminas silanizadas (STARFROST®, Sakura Finetek Europe, NL). Os cortes obtidos foram fixados com acetona a -20 °C (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 10 minutos.

Para as reações de imunolocalização de *Ccl25* e *Ccr9* realizadas nos blastocistos e sítios de implantação, as amostras foram lavadas em PBS, por 15 minutos e na sequencia submetidas ao bloqueio de sítios inespecíficos com uma solução de PBS suplementado com 3% de gelatina pele de peixe (Sigma), por 90 minutos. Para os blastocistos, todas as etapas destas reações foram realizadas em placas esvacadas. Os anticorpos primários anti-*Ccr9* (CD-199 imunoglobulina purificada de camundongo, rat IgG2a, BioLegend, CA, USA) e anti-*Ccl25* (*goat anti-mouse Ccl25/TECK*, anticorpo policlonal purificado por afinidade, R&D Systems, MN, USA) foram diluídos em uma concentração de 1:20 (v/v) em PBS

suplementado com 3% de gelatina de pele de peixe (Sigma). As amostras de blastocistos e cortes congelados tiveram a solução de bloqueio aspirada e foram novamente imersos em solução de PBS com 3% de gelatina de pele de peixe (SIGMA) contendo os anticorpos anti-Ccl25 e anti-Ccr9, mantidos *overnight* a 4 °C e no escuro, para adesão do anticorpo ao tecido alvo. Para cada grupo de blastocistos ou cortes marcados com anticorpos primários, um grupo foi realizado sem anticorpo primário, apenas com PBS e 3% de gelatina de pele de peixe (SIGMA), e mantido como controle de reação, após exposição ao anticorpo secundário. Passado o período de incubação dos anticorpos primários, os blastocistos e cortes congelados foram lavados por três vezes, por 15 minutos em PBS e 3% de pele de peixe (Sigma). Retirado o excesso de solução de lavagem as amostras foram incubadas no escuro por 1 h com os anticorpos secundários *anti-IgG de rato-FITC/* e *anti-IgG de cabra-TRITC* (Verde e Vermelho; R&D Systems, USA) nas concentrações 1:200 e 1:400 em PBS-3% de gelatina de pele de peixe, respectivamente.. Terminado a incubação, as amostras foram lavadas em PBS por três vezes, por 15 minutos e em seguida montadas com uma lâmina de vidro e 15 µL de solução de montagem com DAPI (VectaShield, VectorLab, CA, USA). As amostras foram observadas microscópio de fluorescência Zeiss Axiovision (50M, Zeiss, Germany).

Em complementação a imunohistoquímica de fluorescência, alguns sítios de implantação de 3,5 dg e 7,5 dg foram dissecados, lavados em PBS e fixados em 4% paraformaldeído (Sigma) em PBS 0,1M, pH 7,4 por 12 h. Em seguida, os sítios foram lavados *overnight* em água corrente e submetidos a processamento rotineiro para inclusão em parafina. Cortes seriados de 6 µm de espessura foram então realizados no micrótomo Leica RM2235 (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), corados pela hematoxilina/eosina (HE) e fotografados sob microscopia de luz para análise histológica.

4.8 Expressão e silenciamento de Ccl25 em células de cone ectoplacentários cultivadas

Para confirmar se as células do cone ectoplacentário expressam *Ccl25 in vitro* após 48 h de cultura, lâminas contendo culturas previamente preparadas foram submetidas a imunohistoquímica de fluorescência para a quimiocina Ccl25. As lâminas contendo as células foram lavadas em PBS, fixadas em metanol -20 °C por 10 min. e em seguida, submetidas a protocolo conforme descrito no item acima(ver 4.7).

Oligodeoxinucleotídeos–ODN–antisense (ODNs) são sequências de nucleotídeos sintetizados em laboratório (Tabela 2; IDT DNA Technologies, IA,USA), que ao se ligar especificamente ao RNAm da proteína de interesse impedem sua tradução. As sequências ODNs são tiofosfatadas para prolongar a meia-vida destas interações e conjugadas com

FITC na posição 3', possibilitando o acompanhamento de sua localização em microscopia de fluorescência (YUAN et al., 2008; ZIU et al., 1998).

Neste estudo, utilizou-se sequências de nucleotídeos específicas para hibridizar com o RNAm de Ccl25 (Tabela 2), desenhada através da empresa IDT DNA Technologies (IA, USA). As sequências obtidas foram inicialmente eluídas em água ultra pura seguindo as sugestões do fabricante e em seguida em 100 µL de meio DMEM (Sigma) sem antibióticos e SFB para a obtenção de uma concentração final de 0,1 µg/µL. A esta solução foi adicionado 3 µL do reagente de transfecção X-tremeGene (Roche Molecular System, NJ, USA). Cinquenta microlitros dessa solução foi adicionado a 350 µL de meio de cultura DMEM (concentração final = 0,0125 µg/mL).

Culturas de cones ectoplacentários a serem submetidas ao silenciamento do RNAm de Ccl25 foram cultivadas por 12 h em condições padrão. Em seguida foram lavadas várias vezes com meio DMEM sem antibióticos e SFB e finalmente mantidas por 48 h com o meio DMEM sem antibióticos e SFB, mas acrescido de ODNs. Amostras controle foram incubadas com sequência de ODNs (*Scramble*) sem relação com qualquer RNAm conhecido.

Após 24 e 48 h de incubação, estas culturas foram coletadas e processadas para a avaliação da expressão de Ccl25 conforme descrito anteriormente (ver 4.6.1). Para avaliar a eficiência do protocolo de transfecção com ODN-Ccl25 e controle (*Scramble*), ambos conjugados com o fluorocromo FITC (verde) na região terminal da sequência, as culturas foram observadas em microscópio de fluorescência. Após 48 h de cultura, as lamínulas de vidro contendo as culturas expostas aos ODNs foram lavadas em PBS, fixadas em metanol (Labsybt) a -20 °C por 10 min. e em seguida montadas com 15 µL meio de montagem com DAPI (VectaShield, Vector Lab, USA) em uma lâmina de vidro.

ODN	Antisense/Sense
ODN-Ccl25	A*T*G* G*A* G*G*A* T*G*G* G*A*G* G*A*G* T*C*T*G/3FluorT C*A*G* A*C*T* C*C*T* C*C*C* A*T*C* C*T*C* C*A/3FluorT
(Scramble) Controle)	G*A*G* G*T*G* T*A*G* C*G*A* T*G*T* G*T*C* T*A/3FluorT

TABELA 2 - Sequência de nucleotídeos desenhados para silenciamento gênico de Ccl25. (*) indicam ligações tiofosfatadas. (3FluorT) fluorocromo (FITC). Desenhados por: IDT DNA Technologies, IA, USA.

4.9 Atividade quimiotática de Ccl25

4.9.1 Delineamento experimental

Atividade quimiotática de Ccl25 foi avaliada em ensaios utilizando câmaras bipartites do tipo transwell, cultura de células trofoblásticas e de blastocistos e PBMCs coletados de fêmeas aos 7,5 dg. Os compartimentos inferiores de placas de 24 poços do tipo Transwell (Millipore, Cork, IRL) receberam: a) cones ectoplacentários ($n=5$ /lamínula) previamente cultivados por 12 h em lamínulas de vidro conforme previamente descrito; b) blastocistos (5-8/lamínula) previamente cultivados por 1 h como previamente descrito; (c) apenas meio de cultura (controle); (d) apenas meio de cultura suplementado com a proteína Ccl25 recombinante de camundongo (ProSpec, Rehovot, ISR) a 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL; (e) culturas de cones ectoplacentários silenciadas com Ccl25 ODN-antisense; (f) culturas de cones ectoplacentários tratados com sequencia ODN controle.

O meio de cultura utilizado foi o meio DMEM suplementado com insulina (10 µg/mL, Gibco^R, Life Technologies, CA, USA), antibióticos (100 µg/mL estreptomicina, 10 µL/mL gentamicina, 10 µg/mL amphotericina; Cultilab, SP, BR), *Mito+ Serum Extender* (0,2 ng/mL, Becton Dickinson Lab, MA, USA), sem a adição de soro bovino fetal. Todos os compartimentos inferiores do transwell, independente do experimento a ser realizado, receberam 400 µL de DMEM sem SFB (acrescido de Ccl25 recombinante nos experimentos em que esse fator estava sendo testado).

Os blastocistos mantidos por 1 h em cultura em meio HTF suplementado com 10% de SFB foram gentilmente lavados em três gotas de 100 µL de meio DMEM suplementado a 37 °C e acomodados diretamente sobre a superfície plástica dos poços de cultura.. Os cones ectoplacentários mantidos *overnight* em cultura para adesão à lamínula, foram igualmente lavados com 1 mL de DMEM a 37 °C (3X), sendo as lamínulas então transferidas para o compartimento inferior do transwell.

No compartimento superior do transwell, sobre a membrana com poros de 8 µm, foram transferidas $2,6 \times 10^5$ PBMCs / 250 µL de meio DMEM, obtidas conforme protocolo previamente descrito. Um dos grupos contendo apenas cones ectoplacentários na câmara inferior recebeu células mononucleares previamente tratados com anticorpo anti-Ccr9. Para isso, as PBMCs foram centrifugadas como descritos anteriormente e o *pellet* ressuspensionado em 1 µg/µL de anti-CD-199 (CCR9, rat IgG2a, BioLegend, CA, USA) em meio DMEM sem SFB. Após 30 minutos de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, as células foram novamente centrifugadas e o *pellet* ressuspensionado em meio sem SFB. As células foram então contadas e $2,6 \times 10^4$ células tratadas foram colocadas na câmara superior do transwell em um volume de 250 µL de meio.

4.9.2 Avaliação dos ensaios quimiotáticos

O percentual de PBMCs que migraram através dos poros da membrana do transwell nos diferentes grupos foi avaliado por meio da contagem de PBMCs presentes no compartimento inferior do Transwell. Para isso, o volume total de meio de cultura, na porção inferior do transwell, foi aspirado cuidadosamente e, as células imediatamente contadas após colocação com 0,4% azul de Trypan (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen, CA, USA). O número de PBMCs presentes neste volume de meio após 48 h de ensaio de quimiotaxia foi determinado em relação ao total de $2,6 \times 10^5$ PBMCs adicionados inicialmente.

4.10 Efeito da quimiocina Ccl25 sobre a proliferação, morte e invasão das células trofoblásticas

Uma possível atividade funcional de Ccl25 sobre o trofoblasto foi avaliada em utilizando-se culturas de cones ectoplacentários obtidos aos 7,5 dias de gestação, Ccl25 recombinante de camundongo (ProSpec) e ensaios de proliferação celular, morte celular e de invasão em câmaras *Transwell* (Millipore, Cork, IRL) com membrana com poros de 8 μ m de diâmetro. Os experimentos utilizaram a concentração de até 1 μ g/mL de Ccl25 recombinante e os ensaios foram comparados a culturas controle, não tratadas.

4.10.1 Ensaio de proliferação

Culturas de cones ectoplacentários (realizados em triplicatas, e repetidos pelo menos duas vezes em diferentes ocasiões) foram realizadas conforme previamente descrito. Após 24 h de cultivo, essas culturas lavadas várias vezes em meio DMEM suplementado com insulina e antibióticos porém sem SFB. As culturas então receberam 500 μ L de meio DMEM suplementado sem SFB acrescido de Ccl25 recombinante de camundongo (ProSpec) na concentração final de 1 μ g/mL. As culturas foram mantidas a 37 °C por 24 h em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. As células foram então lavadas em DMEM suplementado sem soro e incubadas por 90 minutos no mesmo meio acrescido de uma solução de bromo-deoxi-uridina (BrdU, 1:1000, v/v) (5-Bromo-2'-deoxy-uridine-Labeling and Detection Kit, Roche Molecular System, USA).

Em seguida as células foram lavadas três vezes com 250 μ L da solução de lavagem conforme instrução do fabricante do Kit e fixadas por 20 min a -20 °C em etanol/50mM glicina (Sigma). Após novas lavagens as células foram incubadas com anticorpo primário

anti-BrdU (diluída 1:10 em tampão indicado pelo fabricante) por 30 min, a 37 °C, em câmara úmida e no escuro. Após incubação, as células foram novamente lavadas e incubadas a 37 °C, em câmara úmida e no escuro com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo FITC (diluído 1:10). As lâminas foram então montadas em lâminas de vidro contendo 15 µL meio de montagem com DAPI (Vectashield, Vector lab, USA) e observadas em microscópio de fluorescência com filtro de 515-565 nm (verde). Os índices proliferativos foram calculados em todos os experimentos a partir do número de núcleos corados pelo DAPI (azul) / número de núcleos fluorescentes para a reação de BrdU (verde) em 3 campos de cada cultura, aumento final de 200 x. Amostras controle da reação, omitiram o uso da bromodeoxiuridina nas culturas e amostras controle do experimento, não receberam o Ccl25 recombinante.

4.10.2 Ensaio de morte celular – TUNEL

O índice de morte celular por apoptose foi realizado utilizando-se o Kit *In Situ Cell Death Detection* (Roche Molecular System, NJ, USA) conforme as indicações do fabricante. Culturas de cones ectoplacentários cultivadas por 24 h em 500 µL meio DMEM suplementado sem SFB contendo ou não 1 µg/mL de mrCcl25. As células foram então: lavadas em PBS, fixadas em 4% paraformaldeído em PBS 0,1M pH 7,4 por 1 h, novamente lavadas em PBS, permeabilizadas com tampão citrato de sódio (Sigma, MO, USA) 0,1 M acrescido de 0,01% Triton-X (Sigma) por 2 min em gelo e finalmente lavadas em PBS. As amostras fixadas foram então incubadas em 50 µL de solução de marcação (450 µL de *label solution* e 50 µL de *enzyme solution* conforme recomendação do fabricante do Kit) e mantidas por 1 h a 37 °C, em câmara úmida e no escuro. Terminada a incubação, as células foram lavadas três vezes em PBS, as lâminas montadas em lâminas de vidro sobre 15 µL de meio de montagem com DAPI e fotografadas em microscopia de fluorescência com filtro de detecção de 515-565 nm (verde). O índice de morte por apoptose foi calculado contando-se o número de núcleos corados por DAPI (azul) / o número de núcleos fluorescentes para reação de TUNEL (verde). Como controle da especificidade da reação foram realizadas reações com solução de marcação porém sem a enzima de marcação. Como controle do experimento foram utilizadas amostras que não receberam o Ccl25 recombinante.

4.10.3 Ensaio de Invasão Celular – Transwell

Ensaio de invasão foram realizados utilizando-se câmaras do tipo Transwell (Millipore, IRL) com poros de 8 μm previamente revestidos com matrigel (BD *Matrigel*TM *Basement Membrane Matrix*, NJ, USA). Para isso, as câmaras superiores receberam sobre sua membrana com poros 10 μL de uma solução 1:1 (v/v) de DMEM estéril e matrigel, a 4 °C. O matrigel foi deixado para polimerizar nas placas a 37 °C em incubadora úmida e com 5% CO_2 por 30 min. Após a polimerização, os compartimentos superiores do sistema receberam cerca de 5 cones ectoplacentários obtidos aos 7,5 dias de gestação recém coletados e lavados em PBS com antibióticos em 250 μL de meio DMEM suplementado, sem SFB.

O compartimento inferior do Transwell recebeu 400 μL de DMEM acrescido de Ccl25 recombinante de camundongo nas concentrações de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e apenas meio de cultura nos grupos controles. Após 48 h de incubação a 37 °C em condições de cultivo, o Transwell foi cuidadosamente retirado, lavado em PBS e as células presentes na membrana do Transwell fixadas por 10 min em metanol a -20 °C. As membranas do Transwell foram então recortadas e colocadas sobre lâminas de vidro, aonde receberam sobre 15 μL de meio de montagem acrescido de DAPI para coloração nuclear e cobertas por lamínulas. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência e os núcleos marcados com DAPI na porção inferior da membrana do Transwell foram contados para a avaliação do potencial invasivo das células dos cones ectoplacentários. Todos os grupos experimentais foram realizados em triplicatas e repetidos pelo menos duas vezes em diferentes ocasiões.

4.11 Expressão do receptor Ccr9 em células mononucleares do sangue periférico

Com o objetivo de investigar a expressão do receptor Ccr9 nas populações de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) durante o processo de implantação embrionária, PBMCs de fêmeas não grávidas e aos 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 e 7,5 dg foram analisados por citometria de fluxo. Para isso, as PBMCs isoladas do sangue total por gradiente de Ficoll, foram contadas e criopreservadas a -80 °C até o momento de uso (até que todos os períodos de gestação fossem adquiridos). Para a citometria de fluxo, as células foram descongeladas (ver 4.5), separadas em triplicatas de lotes contendo de 5×10^5 células/mL em meio de cultura DMEM, lavadas com PBS estéril, centrifugadas (1.800 rpm a 4 °C por 10 min) e, imediatamente fixadas em metanol (Labsynth, SP, BR) a -20 °C por 10 min. Após a fixação, as PBMCs foram lavadas e centrifugadas várias vezes e finalmente diluídas em tampão de permeabilização (PBS acrescido de 0,1% de Tween 20)

durante 20 min, a temperatura ambiente. Lavagens foram repetidas e seguidas por: bloqueio com PBS suplementado com 2 % de soro de camundongo (Sigma) por 1 h; incubação por 30 min com os seguintes anticorpos (Tabela 3). Após a incubação as células foram lavadas em PBS três vezes em repetidas centrifugações e a aquisição dos dados foi efetuada por citômetro de fluxo (BD FACS Canto II, CA, USA) e analisados com o software FlowJo®. A caracterização das populações de células mononucleares do sangue periférico que expressam Ccr9 foi determinada conforme Tabela 3. Foram adquiridos 50.000 eventos de células viáveis por amostra. Para compensação do citômetro, foram utilizados tubos com células mononucleares monomarcadas para cada um dos anticorpos e seus respectivos controles isotípicos.

<i>Fluorocromos</i>	<i>Cluster of differentiation (CD)</i>	<i>Populações Celulares</i>
CD3-APC	CD3 ⁺	Linfócitos T
CD4-APC/Cy7	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ Ccr9 ⁺	Linfócitos T $\gamma\delta$
CD8 α -PacificBlue	F4/80 ⁻	Células Dendríticas
CD11c-PE/Cy7	F4/80 ⁻ CD8 ⁻ CD11c ⁺ Ccr9 ⁺ α 4 β 7 ⁺	Células Dendríticas Mielóides
CD11b-APC/Cy7	F4/80 ⁻ CD8 ⁺ CD11c ⁺ Ccr9 ⁺ α 4 β 7 ⁺	Células Dendríticas Linfóides
F4/80-FITC	F4/80 ⁺ CD11c ⁺ CD11b ⁻ Ccr9 ⁺ α 4 β 7 ⁺	Monócitos (M1)
α 4 β 7-PE	F4/80 ⁺ CD11c ⁻ CD11b ⁻ Ccr9 ⁺ α 4 β 7 ⁺	Monócitos
Ccr9-PE/Cy5	Ccr9 ⁺	Todos

TABELA 3 - Caracterização das populações de células mononucleares do sangue periférico durante o período de implantação embrionária; CD3;CD4;CD8 α ;CD11c;CD11b;F4/80; α 4 β 7(R&D Systems, MN, USA); Ccr9-PE/Cy5(anti-CCR9-Cy5.5 (IgG2a de rato anti-CCR9, CD199, BioLegend, CA, EUA; IgG de cabra anti-IgG de rato - PE/Cy5.5, Abcam, EUA).

4.12 Análise estatística

Os dados de citometria de fluxo e da análise da população de PBMC Ccr9⁺ foram apresentados como média $\pm$ DP. A comparação entre os grupos experimentais e controle foi analisada pelo teste *t* de Student e Two-Way ANOVA. As expressões gênicas dos ensaios de PCR em tempo real foram comparadas entre os diferentes grupos através da análise de variância (One-Way ANOVA) seguido por teste de Tukey. Os valores obtidos para os ensaios de quimiotaxia foram analisados pelo teste One-way ANOVA. Os índices de morte celular (TUNEL), de proliferação (BrdU) e de taxas de invasão foram comparados pelo teste *t* de Student. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerado estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão diferencial de *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* no compartimento materno e fetal durante a fase de implantação embrionária

Níveis significativamente maiores de expressão dos transcritos de *Ccl25* na interface materno-fetal foram observados no cone ectoplacentário aos 7,5 dias de gestação ($0,2076 \pm 0,0083$, $p < 0,001$) em comparação a blastocistos de 4,5 ($0,0099 \pm 0,0032$) e 5,5 dias de gestação ($0,0136 \pm 0,0100$, Figura 2a), não sendo detectado no blastocisto de 3,5 dias de gestação. Na porção materna da interface, a abundância dos transcritos de *Ccl25* apresentou valores basais de expressão ($0,0115 \pm 0,0058$) e sem diferenças significativas entre os dias de gestação estudados (Figura 2b).

Neste mesmo período, não foi detectada a expressão do receptor *Ccr9* nas células trofoblásticas do blastocisto e do cone ectoplacentário, em nenhum dos dias de gestação analisados. No compartimento materno, a expressão foi baixa no dia 3,5 de gestação ($0,0316 \pm 0,0228$), com aumento significativo apenas no dia 7,5 de gestação ($0,0564 \pm 0,0315$, $p < 0,0067$, Figura 2c). A abundância dos transcritos de *Ccr9* em PBMCs apresentou um aumento significativo de seus transcritos no dia 4,5 de gestação ($0,3919 \pm 0,1344$, $p < 0,0055$, Figura 2d) comparado com os demais dias de gestação. Todas as reações tiveram a curva de dissociação do *primer* para o produto de *Ccl25*, *Ccr9* e do controle endógeno *YWHAZ* confirmadas (dados não demonstrados).

Figura 2 - Expressão gênica de *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* durante a fase de implantação embrionária. A quantificação relativa dos transcritos de *Ccl25* e *Ccr9* foi acessada por RT-qPCR. **(a)** Expressão de *Ccl25* em blastocistos aos 3,5, 4,5 e 5,5 dias de gestação e em cones ectoplacentários aos 7,5 dias de gestação. **(b)** Expressão gênica de *Ccl25* no compartimento materno nos dias 3,5, 4,5, 5,5 (endométrio) e 7,5 dias de gestação (decídua). **(c)** Abundância de transcritos de *Ccr9* no compartimento materno nos dias 3,5, 4,5, 5,5 (endométrio) e 7,5 dias de gestação (decídua). **(d)** Expressão de *Ccr9* em PBMCs obtidos de fêmeas aos 3,5, 4,5, 5,5 e 7,5 dias de gestação. One-Way ANOVA; * $p < 0.0001$; ** $p < 0.05$.

5.2 Imunolocalização de *Ccl25* e seu receptor *Ccr9* na interface materno fetal

A caracterização das fases de pré-implantação, implantação e pós-implantação foi realizada por meio de análise histológica (HE) dos sítios de implantação aos 3,5 e 7,5 dias de gestação, respectivamente. A relação entre o embrião e o endométrio e as características morfológicas desses sítios de implantação serviram de base para as análises imunohistoquímicas que se seguiram.

No dia 3,5 de gestação, a grande maioria dos embriões analisados mostrou-se sob a forma de blastocisto precoce, localizados na luz da cripta uterina. Estes embriões apresentavam diminuta cavidade blastocélica, limites mal definidos entre o

trofotoderma e embrioblasto e alguma proximidade com o epitélio uterino, íntegro e sem evidência de alterações morfológicas (Figuras 3a-b). Eventualmente leucócitos eram observados na luz ou por entre as células epiteliais. O estroma endometrial da cripta uterina mostrou-se mais condensado na região subepitelial contendo células poligonais. No dia 5,5 de gestação os blastocistos apresentavam embrioblasto definido, assim como trofoblasto mural e polar. O trofoblasto mural apresentava células gigantes em contato com o epitélio uterino em toda a sua extensão e as células estromais mostravam aspecto epitelióide e mantinham-se bastante próximas umas das outras. No dia 7,5 de gestação (Figura 4a), na região abembrionária, o trofoblasto mural formava uma rede de células gigantes com prolongamentos e por entre os quais percolava sangue materno. Na região embrionária, o crescimento do trofoblasto polar formava uma excrescência, o cone ectoplacentários.

A quimiocina Ccl25 foi imunolocalizada nas células do trofotoderma nos dias 4,5 e 5,5 de gestação, tanto na região polar como na mural (Figura 3c-f). No endométrio, nessas fases da gestação, reatividade semelhante foi observada no epitélio uterino luminal e glândular (Figura 3g-j). Reações controle não mostraram qualquer reatividade ao anticorpo secundário (Figura 3k).

No dia 7,5 de gestação, após a implantação embrionária a quimiocina Ccl25 foi imunolocalizada nas células trofoblásticas ao redor de todo o embrião (Figura 4b-d, f-g). As reações controle não mostraram reatividade inespecífica (Figura 4e).

Figuras representativas da imunolocalização do receptor Ccr9 nos sítios de implantação entre os dias 4,5 e 7,5 de gestação estão apresentadas nas Figuras 5 e 6. Na fase pré- e implantacional, células imunoreativas foram observadas na região mais profunda da decídua, ao redor de vasos sanguíneos e em células localizadas por entre as fibras do miométrio (Figura 5a-g). Aos 7,5 dias de gestação, células imunomarcadas para o receptor Ccr9 também foram observadas no interior de vasos sanguíneos endometriais próximos ao embrião e nos espaços deixados por entre a rede de células trofoblásticas na periferia do cone ectoplacentário.

Em ensaios de imunofluorescência com dupla marcação para Ccr9 e Ccl25 mostraram a localização de células Ccr9+ em estreita proximidade com as células trofoblásticas do cone ectoplacentário (Figura 6a-d). Reações controle em que os anticorpos primários foram omitidos não apresentaram qualquer reatividade (Figura 5h-k; Figura 6e-h).

Figura 3. Morfologia (a-b) e imunolocalização de Ccl25 (c-k) em blastocistos (c-f) e em sítios de implantação (g-j). (a-b) Preparado histológico corado pela Hematoxilina-Eosina de um sítio de implantação aos 3,5 dias de gestação. A ponta de seta indica um linfócito na luz uterina. (b) Blastocisto; (ep) Epitélio uterino; (en) Endométrio. (c) Blastocisto (b) expandido aos 4,5 dias de gestação. Notar a reatividade das células superficiais (trocoblastoderma) para o anticorpo anti-Ccl25 conjugado a FITC (verde). (d-f) Blastocisto (b) aos 5,5 dias de gestação com reatividade (verde) para a proteína Ccl25 nas células trocoblásticas gigantes (inserto, maior aumento da região # da Figura 3f), que se dispõem ao redor do embrião (*) (d, Anti-Ccl25-FITC; e, DAPI: núcleos azuis). f, Imagem sobreposta das Figuras d-e. (h-j) Epitélio glandular (g) reativo ao anti-Ccl25 em sítios de implantação aos 4,5 dias de gestação (h, Anti-Ccl25-FITC; i, DAPI: núcleos azuis; j, Imagem sobreposta das Figuras h-i). (k) Controle em que o anticorpo primário foi omitido da reação (imagens sobrepostas filtro FITC/DAPI). (ep) Epitélio uterino e (en) endométrio de um sítio de implantação aos 4,5 dias de gestação. Inserto, blastocisto (b) aos 4,5 dias de gestação.

Figura 4 - Imunolocalização de Ccl25 em cones ectoplacentários de 7,5 dias de gestação. (a) Preparado histológico corado pela Hematoxilina-Eosina. Notar que células trofoblásticas gigantes revestem externamente o embrião na região polar (gt) aonde compõem o cone ectoplacentário (ec) e na região mural (mt). Essas células estão em contato direto com a decídua (d). (b-g) Imunolocalização de Ccl25 é observada nas células trofoblásticas murais (mt) e do cone ectoplacentário (ec). (e) Controle em que o anticorpo primário foi omitido da reação (FITC/DAPI). Barra em a-d,f-g= 100 µm; em b = 20 µm; em e = 200 µm. (b,f) FITC. (c) DAPI. (d-e,g) Sobreposição das imagens com filtro FITC/DAPI.

FIGURA 5 - Imunolocalização de Ccl25 (TRITC: vermelho) e Ccr9 (FITC: verde) em sítios de implantação aos 5,5 dias de gestação. (**a-d**) A colocalização de Ccr9 e Ccl25 mostra células do epitélio uterino (ep) reativas ao Ccl25 (vermelho) e células Ccr9⁺ nas porções mais profundas do endométrio (en), próximo ao miométrio (m). (**e-g**) Células Ccr9⁺ encontradas na região mesometrial em estreita proximidade a um vaso sanguíneo. (**h-k**) Reação controle em que os anticorpos primários foram omitidos. Barra = 100 μm em **a-d**; em **e-g** = 200 μm. (**a, d-e, g-h,k**) DAPI (núcleos, azuis). (**b,i**) TRITC. (**c,f,j**) FITC. (**d,k**) imagens com filtro TRITC, FITC e DAPI, sobrepostas. (**f**) imagens com filtro FITC e DAPI sobrepostas.

FIGURA 6. Expressão de Ccl25 e seu receptor Ccr9 em cones ectoplacentários e em sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação. **(a-d)** Dupla marcação para Ccl25 (TRITC: vermelho) e Ccr9 (FITC: verde) na região do cone ectoplacentário (ec). As setas (em **b** e **d**) indicam a presença de leucócitos reativos ao anticorpo anti Ccr9 (FITC) nas malhas das células trofoblásticas Ccl25+ (em **c** e **d**, vermelho). **(e-h)** Controle em que os anticorpos primários foram omitidos da reação. d – decidua. **(a,d-e,h)** DAPI. **(b,g)** Filtro para FITC. **(c,f)** Filtro para TRITC. **(d,h)** Imagens sobrepostas (DAPI/FITC/TRITC). Em **a-d**, barra = 100 µm; em **e-h**, barra = 200 µm.

5.3 Silenciamento da expressão de *Ccl25* por ODNs

A capacidade do ODN em penetrar nas culturas celulares e efetivamente neutralizar o RNA mensageiro da quimiocina *Ccl25* foi avaliada por imunofluorescência das células tratadas com ODN-*Ccl25* e ODN-*scramble* conjugado a FITC. Durante 48 h de cultura (12 h, 24 h e 48 h), as células foram analisadas em microscopia de fluorescência mostrando um aumento gradativo de células fluorescentes. Cerca de 90% das células apresentaram imunofluorescência para o ODN-FITC conjugado após 48 h de cultura (Figura 7a-d).

A neutralização do RNA mensageiro pelo *Ccl25*-ODN e seu controle *scramble*-ODN também foi avaliada por qPCR. A quantificação de transcritos de RNAm de *Ccl25* mostrou uma diminuição significativa no grupo tratado com *Ccl25*-ODN ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle (cultura não tratada de cones ectoplacentários) e grupo controle ODN-*scramble*. Grupos controle cone ectoplacentário e *scramble* não apresentaram diferenças entre si (Figura 7e).

FIGURA 7 - Cones ectoplacentários cultivados por 48 h. As figuras mostram cones ectoplacentários tratados com ODN-*Ccl25 antisense* (a-c) e com ODN-*scramble antisense* (d), ambos conjugados a FITC. Notar em (c), a imunofluorescência em células trofoblásticas gigantes. (e) A abundância dos transcritos de *Ccl25* nos cones ectoplacentários diminuiu significativamente após tratamento com ODN anti-*Ccl25* (Ccl25^{-/-}) quando comparados aos grupos controle (não tratado) e ODN-*scramble* (** $p < 0,001$). (a,b,d) 20 x. (c) 40 x. (a-d) núcleos corados em azul pelo DAPI.

5.4 Efeito quimiotático do cone ectoplacentário sobre PBMCs

A expressão proteica da quimiocina Ccl25 nas células do cone ectoplacentário cultivados por 48h foi avaliada por imunofluorescência. Células trofoblásticas gigantes localizadas na periferia do cone mostraram reatividade mais intensa do que as demais células desta estrutura (Figura 8a-d). Uma possível atividade quimiotática para PBMCs por parte dessas células cultivadas e de

blastocistos foi avaliada em ensaios específicos, comparados a meio contendo diferentes concentrações de Ccl25 recombinante. Nestes ensaios também foram utilizadas culturas de cones ectoplacentários previamente tratados para o silenciamento de Ccl25 com oligodeoxinucleotídeos *antisense* (ODN).

Os ensaios utilizando a adição de Ccl25 recombinante de camundongo levaram a um aumento significativo da atividade migratória de PBMCs nas concentrações de 0,5 µg/mL ($10,45 \pm 1,39 \times 10^4$) e de 1 µg/mL ($12,23 \pm 0,75 \times 10^4$) em comparação ao controle (sem proteína recombinante, $4,13 \pm 1,82 \times 10^4$, $p < 0,05$) ou com proteína recombinante na concentração de 0,25 µg/mL ($5,10 \pm 0,64 \times 10^4$; $p < 0,05$; Figura 8E).

Atividade migratória aumentada relevante das PBMCs também foi observada nos ensaios com blastocistos ($10,33 \pm 0,47 \times 10^4$) e cones ectoplacentários ($10,66 \pm 0,35 \times 10^4$, $p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas entre os ensaios utilizando blastocistos e cones ectoplacentários ou entre os ensaios com a proteína recombinante nas concentrações de 0,5 µg e 1 µg/mL.

Os ensaios realizados com cones ectoplacentários tratados com Ccl25-ODNs com redução da expressão de Ccl25 mostraram uma significativa redução da atividade migratória das PBMCs ($7,0 \pm 1,63$, $p < 0,05$) em relação ao controle com *scramble*-ODN ($13,0 \pm 2,16$; $p < 0,05$; Figura 8E).

Redução significativa da atividade migratória das PBMCs também foi observada nos ensaios utilizando PBMCs previamente imunoneutralizados para Ccr9 ($6,65 \pm 1,24$, $p < 0,05$, Figura 8E) em relação aos ensaios utilizando 0,5 µg e 1,0 µg/mL de Ccl25 recombinante e PBMCs não imunoneutralizados.

FIGURA 8 - (A-D) Expressão proteica da quimiocina Ccl25 pelas células trofoblásticas (Tr) do cone ectoplacentário (Cn). **(B,D)** Ccl25 foi imunolocalizado (verde) no citoplasma de células gigantes do cone ectoplacentário. **(C)** Controle de reação em que o anticorpo primário foi omitido. **(A)** Microscopia de luz invertida, Nomarski. **(B-D)** Filtro DAPI. **(B,D)** Sobreposição das imagens com filtro FITC/DAPI. Em **A-C** barra = 100 μ m, em **D** = 50 μ m. **(E)** O histograma mostra os valores médios ($\pm$ desvio padrão, barras) de células que migraram após 48h de cultura em ensaios de quimiotaxia utilizando diferentes concentrações de Ccl25 recombinante de camundongo (0,25, 0,5 e 1,0 μ g/mL), culturas de blastocistos (Blast), culturas de cones ectoplacentários (EC), culturas de cones ectoplacentários tratados com ODN-Ccl25 (Ccl25^{-/-}), ulturas de cones ectoplacentários tratadas com ODN-scramble (Scr) e PBMCs previamente tratados com anticorpos anti Ccr9. ** $p < 0,05$ em relação ao controle e ao tratamento com Ccl25 recombinante na concentração de 0,25 μ g/mL.

5.5 Efeito do tratamento com Ccl25 sobre a proliferação, morte celular por apoptose e invasividade das células trofoblásticas

O tratamento de culturas de cone ectoplacentário por 24 h com 1µg/mL de Ccl25 recombinante não apresentou alterações na atividade proliferativa das células trofoblásticas quando comparado aos ensaios controle. Os índices proliferativos foram de $0,2867 \pm 0,008$ e $0,2587 \pm 0,04$, ($p=0,700$) respectivamente para ensaios tratados e controle (Figura 9a).

Os índices de morte celular por apoptose também não mostraram alterações em função do tratamento com Ccl25 ($0,1193 \pm 0,023$ tratado vs. controle $0,1267 \pm 0,032$, $p=1,0$).

A habilidade das células trofoblásticas em invadir a membrana de matrigel também não foi alterada com o tratamento com Ccl25 (1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,25µg/mL) em relação ao controle sem tratamento(respectivamente, $430 \pm 78,9$, $383,3 \pm 27,98$, $361,5 \pm 46,58$ vs. controle $444,3 \pm 47,13$; $p=0,151$).

FIGURA 9 - Efeito de Ccl25 recombinante sobre a proliferação (a, BrdU), morte celular por apoptose (b, TUNEL) e capacidade invasiva das células trofoblásticas (c, ensaio de invasão) em culturas de cones ectoplacentários. Nenhum ensaio mostrou diferenças significativas em relação ao respectivo controle sem tratamento.

5.6 Análise das populações de leucócitos mononucleares em fêmeas prenhes

5.6.1 Expressão de CD3, CD11C, F4/80 em PBMCs de fêmeas prenhes

Com o intuito de definir que populações leucocitárias prevaleciam durante a gestação, ensaios de citometria de fluxo foram realizados com células mononucleares obtidas do sangue periférico (PBMC) de camundongos fêmeas prenhes (dias 3,5, 4,5 5,5, 6,5 e 7,5 de gestação) e não prenhes. Foram inicialmente avaliadas as populações celulares CD3 (linfócitos), CD11c e F4/80 (macrófagos/célula dendríticas).

Em relação às fases do processo implantacional foram observadas alterações relevantes na fase de pré-implantação, dias 3,5 e 4,5 de gestação. Houve uma significativa redução das populações de linfócitos CD3⁺ (dia 3,5 dg, $p < 0,0001$ em relação ao grupo de fêmeas não prenhes) e de CD11c⁺ e F4/80⁺ (dia 4,5 dg, $p < 0,0001$ em relação ao grupo de fêmeas não prenhes). Aumento significativo nesta fase foi observado em relação às células F4/80⁻ ($p < 0,0001$ em relação ao grupo de fêmeas não prenhes) (Figura 10a-d).

Durante a fase de implantação (5,5 e 6,5 dias de implantação) houve aumento significativo das células CD3⁺, F4/80⁺ e CD11c⁺ ($p < 0,0001$) em relação às fases de pré-implantação, exceto para as células F4/80⁻ ($p < 0,0001$ em relação ao dia 4,5 de gestação) (Figura 10a-d).

Na fase de pós-implantação (7,5 dias de gestação) observou-se uma expressiva redução do percentual de células CD3⁺ e F4/80⁺ ($p < 0,0001$) em relação a fase de implantação (5,5 e 6,5 dias de gestação). Neste período também foi detectado aumento significativo de células F4/80⁺ e CD11c⁺ ($p < 0,0001$, Figura 10a-d). Novas análises por citometria de fluxo foram realizadas para avaliar que populações e subpopulações destas células expressavam o receptor Ccr9 e a integrina $\alpha 4\beta 7$, simultaneamente.

FIGURA 10 - Percentual de células CD3⁺, CD11c⁺, F4/80⁺ e F4/80⁻ em populações de células mononucleares do sangue periférico ($n=3$, PBMC). (a) Linfócitos T CD3⁺. (b) Células CD11c⁺. (c) monócitos F4/80⁺. (d) Células F4/80⁻. (NG) grupo não prenhe. (a-d) Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas, $p<0.0001$. Barras em cinza claro representam valores encontrados na fase de pré-implantação, em cinza escuro na fase de implantação e em vermelho, na fase de pós-implantação.

5.6.2 Avaliação das subpopulações de linfócitos T

Baseado em trabalhos da literatura que mostram que os principais linfócitos T susceptíveis a atração via Ccl25/Ccr9 são células CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (caracterizados como linfócitos T gama delta) Ccr9⁺, o percentual dessa população foi analisado a partir das células CD3⁺ detectadas nas diferentes fases da gestação e em fêmeas não prenhes (Figura 11). Como pode ser observado na Figura 11b, houve um aumento significativo ($p<0,0037$) do percentual de linfócitos CD3⁺CD4⁻CD8⁻Ccr9⁺ nos dias 4,5 ($94,95 \pm 3,95$), 5,5 ($96,5 \pm 1,2$), 6,5 ($95,35 \pm 0,65$) e 7,5 ($95,3 \pm 2,0$) dias de gestação em relação ao dia 3,5 dg ($89,5 \pm 4,4$) e ao grupo de fêmeas não prenhes ($86,0 \pm 1,65$). Esta subpopulação de células T Ccr9⁺ não apresentou expressão da integrina $\alpha 4\beta 7$ na sua superfície.

(b)

FIGURA 11 - Determinação do percentual de linfócitos $T\gamma\delta Ccr9^+$. (a) Dot plot das populações de linfócitos $T\gamma\delta(CD4^+CD8\alpha^-Ccr9^+)$. (b) A figura mostra a variação significativa no percentual de linfócitos $T\gamma\delta$ que expressam o receptor $Ccr9$ em fêmeas não prenhes (NG) e nos diferentes dias de gestação. percentual médio de células. Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas, $p < 0,0037$). Barras em cinza claro representam valores encontrados na fase de pré-implantação, em cinza escuro, na fase de implantação e em vermelho, na fase de pós-implantação.

5.6.3 Avaliação das subpopulações de monócitos

A caracterização de monócitos com predomínio do perfil M1 foi estimado na subpopulação de células com fenótipo $F4/80^+$ a partir da expressão de CD11b e CD11c (Figura 12). Também foi investigado nessa população subpopulações, Ccr9 e $\alpha 4\beta 7$ positivas. Essa análise mostrou que a porcentagem de células $F4/80^+CD11b^+CD11c^+Ccr9^+\alpha 4\beta 7^+$ no sangue periférico oscila durante a gestação (Figura 12), apresentando valores significativamente mais baixos nos dias 3,5, 5,5 e 7,5 de gestação ($13,45 \pm 1,85$; $12,7 \pm 0,5$; $6,52 \pm 1,92$, respectivamente) em relação ao grupo não prenhe ($28,55 \pm 0,085$, $p < 0,0001$) e valores que retornam aos valores semelhantes aos das fêmeas não prenhes nos dias 4,5 e 6,5 de gestação ($28,55 \pm 0,85$ e $25,85 \pm 1,35$, respectivamente).

A expressão do receptor Ccr9 e da integrina $\alpha 4\beta 7$ também foi avaliada em subpopulações de monócitos com o fenótipo $F4/80^+CD11b^-CD11c^-$. Houve um aumento gradual e significativo do percentual de células $Ccr9^+\alpha 4\beta 7^+$ nos dias 3,5 e 4,5 dg ($1,06 \pm 0,07$ e $1,085 \pm 0,325$, respectivamente) em relação ao grupo de fêmeas não prenhes ($0,565 \pm 0,115$, $p < 0,0001$).

Não houve diferença significativa dos valores médios encontrados no dia 5,5 dg ($0,41 \pm 0,05$) em relação ao grupo não prenhe. Nos dias 6,5 e 7,5 dg, novamente nota-se um aumento significativo dos valores médios encontrados para as populações de monócitos $F4/80^+CD11b^+CD11c^+Ccr9^+\alpha 4\beta 7^+$ ($1,85 \pm 0,160$ e $1,085 \pm 0,375$, respectivamente) em relação ao grupo não prenhe ($p < 0,0001$).

A análise global desses resultados mostraram um predomínio do perfil $F4/80^+CD11b^+CD11c^+Ccr9^+\alpha 4\beta 7^+$ (10 vezes aumentado) em relação ao fenótipo $F4/80^+CD11b^-CD11c^-Ccr9^+\alpha 4\beta 7^+$ ($p < 0,0001$, Figura 12b).

FIGURA 12 - Expressão do receptor Ccr9 e da integrina $\alpha 4 \beta 7^{+}$ em monócitos F4/80⁺. (a) *Dot plot* das populações de monócitos CD11b⁻CD11c⁻Ccr9⁺α4β7⁺ e CD11b⁺CD11c⁺Ccr9⁺α4β7⁺. (b) Análise quantitativa dessas subpopulações celulares em valores percentuais. Barras em cinza claro representam valores encontrados para monócitos CD11b⁺CD11c⁺Ccr9⁺α4β7⁺; em vermelho, monócitos CD11b⁻CD11c⁻Ccr9⁺α4β7⁺. Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,001$).

5.6.4 Avaliação das subpopulações de células dendríticas

Subpopulações de células dendríticas linfoides caracterizadas pelo fenótipo F4/80⁻CD8⁺CD11c⁺ foram avaliadas quanto a expressão do receptor Ccr9 e da integrina $\alpha 4\beta 7$ (Figura 13). Neste estudo, observou-se que o percentual de células dendríticas linfoides apresentou valores médios maiores no dia 3,5 dg ($32,25 \pm 0,15$) quando comparados ao grupo de fêmeas não prenhes ($22,65 \pm 0,15$; $p < 0,0001$). Nos dias subsequentes da gestação observou-se redução relevante destes valores (4,5 dg: $7,21 \pm 0,335$; 5,5 dg: $17,45 \pm 0,05$; 6,5 dg: $16,0 \pm 3,2$; 7,5 dg: $18,35 \pm 0,25$; $p < 0,0001$) sendo a diminuição mais acentuada observada no dia 4,5 dg (Figura 13).

A subpopulação de células dendríticas mieloides foram determinadas pelo fenótipo F4/80⁻CD8⁻CD11c⁺Ccr9⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺. Não se observaram diferenças entre o grupo não prenhe e 3,5 dg, mas houve uma significativa redução dos valores médios em todos os demais grupos (4,5 dg: $6,3 \pm 0,9$; 5,5 dg: $5,94 \pm 0,95$; 6,5 dg: $4,06 \pm 0,44$ e 7,5 dg: $4,20 \pm 0,25$; $p < 0,002$) comparado ao grupo de fêmeas não prenhes ($9,3 \pm 2,1$) e de 3,5 dg ($9,33 \pm 1,5$). Houve ainda aumento significativo dos valores observados entre 4,5 e 5,5 dg ($p < 0,0001$; Figura 13b).

A expressão do receptor Ccr9 e da integrina $\alpha 4\beta 7$ nas subpopulações de células dendríticas linfoides (F4/80⁻CD8⁺CD11c⁺Ccr9⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺) e mieloides (F4/80⁻CD8⁻CD11c⁺Ccr9⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺) evidencia o predomínio do fenótipo linfoide (5-vezes aumentado ($p < 0,0001$; Figura 13b).

FIGURA 13 - Avaliação das populações de células dendríticas linfóides (F4/80⁻CD8α⁺C11c⁺Ccr9⁺α4β7⁺) e mielóides (F4/80⁺CD8α⁻C11c⁺Ccr9⁺α4β7⁺) por citometria de fluxo. (a) Dot plot das populações linfóides (F4/80⁻CD8α⁺C11c⁺Ccr9⁺α4β7⁺) e mielóides (F4/80⁺CD8α⁻C11c⁺Ccr9⁺α4β7⁺). (b) Análise quantitativa das subpopulações de células F4/80⁻/Ccr9⁺α4β7⁺. Barras em cinza claro representam valores encontrados para células dendríticas linfóides (CD8α⁺C11c⁺Ccr9⁺α4β7⁺) e em vermelho, células dendríticas mielóides (F4/80⁺CD8α⁻C11c⁺Ccr9⁺α4β7⁺). Letras sobrescritas diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

Resultados prévios em nosso laboratório já haviam detectado a expressão de Ccl25 em cones ectoplacentários de camundongo no dia 7,5 de gestação (HOSHIDA et al., 2007). Nossos resultados ampliam esses achados mostrando a expressão da quimiocina Ccl25 durante a fase de periimplantação, particularmente por células do endométrio nas fases iniciais da implantação e após a implantação, nas células do trofoblasto. A presença constante dessa quimiocina sugere ações biológicas prógestacionais.

A expressão de Ccl25 no compartimento materno foi baixa e restrita a componentes epiteliais luminais e glandulares, conforme pudemos determinar pelas reações de imunolocalização dessa molécula. Coincidentemente, após a implantação, quando ocorre a perda do epitélio uterino luminal e o desaparecimento das glândulas uterinas, a expressão dessa quimiocina passa a ser realizada pelas células trofoblásticas do embrião recém implantado. A continuidade expressão de Ccl25 e seu aumento na fase de pós-implantação levam à hipótese de um papel regulador entre as interações trofoblasto/endométrio.

Embora a expressão de muitas outras quimiocinas tenham já sido mostradas na interface materno fetal, em humanos e em roedores (MADIGAN et al., 2010; SANTONI; CARLINO; GISMONDI, 2008; TEOH et al., 2014), a expressão da quimiocina Ccl25 nesse compartimento é inédita.

As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, capazes de estimular e regular o movimento dos leucócitos durante sua migração, o que geralmente ocorre do sangue para o tecido. Podem também ser produzidas por vários tecidos, recrutando células em condições homeostáticas e inflamatórias (HOSOE et al., 2004). Tal fato evidencia o perfil regulador e imunomodulador destas moléculas e suas atividades sobre diferentes populações leucocitárias (VICARI et al., 1997).

A quimiocina CCL25 exibe um padrão de expressão única e altamente restrita em comparação com outros membros da família de quimiocinas. É expressa em níveis elevados de forma constitutiva, principalmente no timo e intestino delgado, enquanto o seu receptor funcional e único, o CCR9 (WHITE; IQBAL; GREAVES,

2013) é expresso em subpopulações de timócitos em desenvolvimento e linfócitos intestinais (WHITE; IQBAL; GREAVES, 2013). Baseado na análise da expressão de CCL25 e em dados experimentais, tem sido sugerido um papel-chave na indução da migração e maturação de células T imaturas no timo e na regulação das interações adesivas de linfócitos T ao epitelial intestinal (STENSTAD et al., 2007; SVENSSON et al., 2002).

A atividade das quimiocinas é regulada principalmente através do acoplamento da proteína com seu receptor. Neste contexto, estudou-se a expressão do receptor Ccr9 nos compartimentos materno e fetal. A análise da expressão gênica mostrou receptores Ccr9 apenas no compartimento materno, representado pelo endométrio, em todos os dias da fase de periimplantação estudados. Análises subsequentes mostraram que a população de células Ccr9 reativas no endométrio era prevalentemente leucocitária. Células semelhantes a leucócitos dispostos ao redor de vasos endometriais, em leucócitos intravasculares e em leucócitos presentes nas malhas das células trofoblásticas gigantes do cone ectoplacentário compunham a população de células com potencial responsivo ao Ccl25. Foi interessante notar que a quimiocina Ccl25 expressa no trofoblasto tinha o receptor único expresso em leucócitos decíduais. Em conjunto, a expressão e localização da quimiocina Ccl25 e do seu receptor Ccr9 sugerem um diálogo de sinalização principalmente por parte das células trofoblásticas logo após a implantação (7,5 dias de gestação) e uma capacidade de resposta por parte dos leucócitos maternos. Se as células trofoblásticas, entretanto, estão de fato atraindo/recrutando leucócitos Ccr9+ para o sítio de implantação é uma questão de difícil resposta, aqui avaliada por meio de ensaios quimiotáticos.

Ensaio utilizando co-cultivo de blastocistos ou cones ectoplacentários com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) mostraram a capacidade das células trofoblásticas em atrair leucócitos. Esse efeito foi semelhante à adição da proteína recombinante no ensaio quimiotático e foi em grande parte inibido pelo bloqueio de expressão da proteína Ccl25 nos cones ectoplacentários. A capacidade destas células em atrair leucócitos específicos também foi confirmada nesses experimentos. As taxas de migração das PBMCs foram relevantemente reduzidas quando o receptor Ccr9 foi imunoneutralizado nesta população celular. Estes

achados sugerem fortemente um potencial quimioatraente por parte das células trofoblásticas, recrutando especificamente células Ccr9+.

Estudos mostrando a participação de quimiocinas na seleção específica de leucócitos para o sítio de implantação foram previamente demonstrados (DOMINGUEZ et al., 2005; DRAKE et al., 2001; DU et al., 2014; HANNA et al., 2003). Células citotrofoblásticas humanas expressando moléculas MIP-1 α foram capazes de atrair monócitos e células NK CD56^{bright} em ensaios in vitro, levando à hipótese de que estas células podem exercer diferentes ações sobre os leucócitos na interface materno-fetal (DRAKE et al, 2001). De forma semelhante foi mostrada que além da produção da quimiocina CCL3/MIP-1 α , as células citotrofoblásticas extravilosas humanas também expressam CXCL12/SDF-1, com função quimioatrativa para células *Natural Killer* (NK) da circulação periférica para o sítio de implantação, especialmente as populações com fenótipo CCR5⁺ e CXCR4⁺ (SANTONI; CARLINO; GISMONDI, 2008). Estudos recentes também mostraram que o repertório de pares receptor-quimiocinas expressos na interface materno-fetal pode ser bastante grande quando são consideradas todas as células presentes neste complexo compartimento (células decíduais, endoteliais, glandulares, imunológicas, além das diferentes populações trofoblásticas (DU et al., 2014).

Em uma tentativa de compreendermos as possíveis relações sistêmicas de células imunológicas com o microambiente materno fetal, no recrutamento de leucócitos para sítio de implantação, avalíamos inicialmente a disponibilidade de leucócitos Ccr9+ na circulação materna.

Em relação à gestação, nossos achados mostraram o início do processo de implantação (3,5 e 4,5 dias de gestação) é caracterizado por uma brusca queda no percentual de células que expressam CD3, principal marcador de células T, no total de células que expressam F4/80, marcador de monócitos e em células CD11c. Nota-se um acréscimo apenas nas células F4/80⁻. É possível que essa variação resulte do recrutamento dessas células a territórios específicos pelo organismo, ou como no caso das células F4/80 uma maior entrada no sistema vascular, ambos associados ao quadro gestacional.

A progressão do processo de implantação mostrou-se claramente relacionado ao aumento da percentagem de células F4/80 e CD11c positivas e uma diminuição

das células CD3 e F4/80-. Como o objetivo desse estudo era conhecer a população de células capazes de responder à quimioatratividade da quimiocina Ccl25 produzida pelo trofoblasto, novas avaliações foram realizadas para conhecer subpopulações leucocitárias poderiam estar expressando o receptor Ccr9. A expressão de Ccr9 poderia desta forma, estar relacionada à migração de células específicas para o sítio de implantação ao mesmo tempo em que poderia explicar suas flutuações percentuais sistêmicas, assim como observado em outros modelos (RIVERA-NIEVES et al., 2006).

Na mucosa intestinal, a migração e ativação de células T ocorrem a partir da interação Ccl25-Ccr9, em resposta a ativação por peptídeos de patógenos invasores, apresentados por células apresentadoras de antígeno principalmente a linfócitos $T\gamma\delta$ (UEHARA; FARBER; LOVE, 2002). Ángel Zaballos e colaboradores (1999) mostraram que nestes locais os principais linfócitos T susceptíveis a atração via Ccl25/Ccr9 são células $CD3^+CD4^-CD8^-$ (caracterizados como linfócitos T gama delta) carregando o receptor $Ccr9^+$ em suas superfícies. Nossa análise desta forma prosseguiu analisando o percentual de células $T\gamma\delta Ccr9^+$ a partir das células $CD3^+$ detectadas nas diferentes fases da gestação e em fêmeas não prenhes.

Cabe ressaltar que um aspecto importante no endereçamento dessas células para determinados sítios é a ativação de um sistema que lhes permita interagir com os vasos sanguíneos, passar por entre as células endoteliais e interagir/fixar no tecido alvo para o pleno exercício de suas ações. Este mecanismo de migração/fixação depende primariamente da expressão de ligantes específicos e tecido-dependentes como integrinas e outras moléculas de adesão. Evidências mostram que o recrutamento preferencial de subconjuntos de células T circulantes para determinado órgão envolve uma cascata de adesão de várias etapas que ocorre sobre a superfície das células endoteliais que revestem vénulas pós-capilares. Apenas os linfócitos que expressam o conjunto apropriado de moléculas *homing* são capazes de se realizar a sequencia correta e completa da cascata e sair do fluxo de sangue para o tecido alvo (SCIMONE et al., 2006).

No intestino delgado esse processo se inicia pela expressão seletiva e constitutiva da quimioquina CCL25 por células epiteliais do órgão (KUNKEL et al., 2000) ativando linfócitos que carregam o receptor CCR9 e expressam a integrina

$\alpha 4\beta 7$. A ligação quimiocina receptor por sua vez induz alteração conformacional na integrina $\alpha 4\beta 7$ na superfície dos linfócitos, estabilizando sua ligação com moléculas de adesão celular endoteliais (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e MAdCAM-1) e mediando assim a firme adesão destes linfócitos e sua passagem por diapedese para fora dos limites vasculares. Estes princípios não são únicos, mas parecem constituir um padrão que se repete no timo e em outros locais de inflamação (MARSAL; AGACE, 2012).

Não existem estudos prévios mostrando que integrinas poderiam estar associadas à saída de linfócitos nos sítios uterinos mediadas pela ligação Ccl25/Ccr9. Dessa forma nesse estudo optou-se por analisar a expressão de $\alpha 4\beta 7$ que parece ser um dos mais conservados mecanismos de homing de linfócitos ativados por Ccl25 (COSTA et al., 2012; SUN et al., 2014). No sangue periférico dos camundongos prenhes, nossos resultados mostram aumento significativo, no percentual de linfócitos $T\gamma\delta Ccr9^+$, comparado ao controle não prenhe. Estas células, entretanto, não apresentaram expressão da integrina $\alpha 4\beta 7$. Muitas são as possibilidades de interpretação desses resultados. Mencionando as duas mais óbvias, eles podem significar que as populações $T\gamma\delta Ccr9^+$ aumentadas em nossos achados podem estar expressando outras associações de integrinas, também envolvidas na migração de leucócitos (COSTA et al., 2012; SILVA-SANTOS, 2012; WURBEL et al., 2001) ou que não há recrutamento destes linfócitos nesse momento da gestação. A elucidação dessas outras possibilidades exige, entretanto, a análise futura do repertório de integrinas dos leucócitos uterinos.

As populações de linfócitos T são reguladas por células apresentadoras de antígeno que expressam MHC de classe I e II. Em humanos as células trofoblásticas expressam um grupo particular de moléculas pertencentes ao MHC de classe I, com baixo polimorfismo, representadas por moléculas HLA-C, HLA-E e HLA-G, codificadas por genes não polimórficos de classe I do MHC (KING et al., 2000). Essas moléculas são ligantes específicos de células *Natural Killer* uterinas (uNK) (MADEJA et al., 2011), encontradas na decídua juntamente com macrófagos, células T CD3⁺ e DCs. No presente estudo, os achados evidenciam menor percentual de células F4/80⁺ (importante marcador de monócitos/macrófagos, potentes apresentadores de antígenos) no dia 4,5 dg, com aumento significativo das populações nos dias 5,5 e 6,5 dg, atingindo seu ápice no dia 7,5 dg.

O inverso foi observado em populações de células imunes F4/80⁻, fenótipo que está relacionado há algumas subpopulações de DCs, as quais mostraram aumento expressivo de seus percentuais no dia 4,5 dg, com diminuição gradativa até o dia 7,5 dg. Em modelos murinicos, descobertas recentes descrevem que DCs imaturas (iDCs) podem contribuir para a indução de tolerância, enquanto algumas subpopulações de DCs maduras podem influenciar a geração de respostas pró-inflamatórias (LANGENKAMP, 2000; LUTZ; SCHULER, 2002; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2002), ou seja, diferentes populações de células dendríticas podem estar envolvidas na regulação e modulação do perfil imunológico em períodos distintos da gestação.

As DCs, em camundongos, podem ser classificadas de acordo com a expressão de CD8 α , sendo que DCs CD8 α ⁻ e CD8 α ⁺ são consideradas, respectivamente, como mielóide e linfóide (MALDONADO-LOPEZ, 1999). No presente estudo, foram também avaliados os marcadores F4/80 e CD11c, assim como, o receptor Ccr9 e a integrina α 4 β 7 nas DCs linfóides e mielóide. Blois e colaboradores (2004) mostraram que no útero e sangue periférico de camundongo prenhe há um predomínio de DCs mieloides. Nossos achados corroboram este estudo (dados não mostrados), no que diz respeito ao sangue periférico. Entretanto, ao avaliarmos a expressão do receptor Ccr9 e a integrina α 4 β 7, observamos inversão destes valores, ou seja, DCs linfóides CCR9⁺ α 4 β 7⁺ são predominantes em relação a DCs mieloides CCR9⁺ α 4 β 7⁺.

Em murinos os diferentes subtipos DCs compartilham a capacidade comum em apresentar antígenos às células T e promover a progressão do ciclo celular. No entanto, elas diferem em alguns aspectos relacionados à sinalização de células T que determinam o tipo de resposta imune. Assim, as DCs linfóides têm a capacidade de induzir uma resposta imune cujo perfil predomina citocinas pró-inflamatórias (Th1), enquanto que as DCs mieloides são propensas a induzir resposta imune anti-inflamatória (Th2) (MALDONADO-LOPEZ et al., 1999; MCKENZIE et al, 1998; PULENDRAN et al., 1999). Por outro lado, DCs também estão associadas a mecanismos tolerogênicos, podendo desempenhar dessa forma, um papel protetor e imunorregulador na interface materno-fetal (BLOIS et al., 2007). Além de haver sido descrita a presença de DCs maduras imunoestimulantes no tecido decidual durante

a fase precoce da gravidez humana, evidenciando a participação de DCs na implantação e indução decidual do conceito (KAMMERER et al, 2008).

Em suma, nossos resultados mostraram que as células DC passíveis de serem recrutadas são principalmente DCs linfoides CCR9⁺α4β7⁺ na fase de pré-implantação (dia 3,5 dg) predominando em relação a DCs mieloides CCR9⁺α4β7⁺, corroborando estudos que mostram um perfil inflamatório/tolerogênico na fase de implantação do embrião (SCHMINKEY; GROER, 2014). A presença de Ccr9 nessas células em nossos resultados sugere que a secreção de Ccl25 pelas células trofoblásticas pode estar envolvida com o controle do fluxo de células pró e anti-inflamatórias e de ação tolerogênica no sítio de implantação, com padrões específicos nos diferentes dias da gestação.

Na manutenção da gravidez, além de DCs vários outros mecanismos estão envolvidos com relação à tolerância materna ao feto. O equilíbrio entre a imunidade materna e tolerância na interface materno-fetal tem importância crucial. Estudos sugerem que a tolerância imunológica da mãe também pode ser explicada a partir da função de macrófagos deciduais (HEIKKINEN et al., 2003). Nossos achados, no sangue periférico, mostraram que a expressão de Ccr9 associado à integrina α4β7, em monócitos CD11c⁻, apresentou um aumento expressivo no dia 4,5 dg, com flutuação nos valores até um índice mínimo de células na circulação no dia 7,5 dg. Já nas populações de células F4/80⁺ com predomínio do perfil M1(pró-inflamatórias) Ccr9⁺ α4β7⁺, observou-se uma flutuação no percentual de células durante os períodos de pré e pós implantação, com menor percentual celular no 7,5 de gestação. Estando dessa forma numericamente em menores proporções para serem recrutados nos sítios de implantação, em relação a todas as demais células estudadas. Os macrófagos M1(*classically activated macrophages*) tem um perfil mediador de respostas inflamatórias. Esta população de células tem atividade aumentada na produção de citocinas pró-inflamatórias (Th1) como TNF-α, IL-6, IL-12 (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). O aumento da população de células M1 Ccr9⁺ α4β7⁺ disponíveis na circulação no dia 7,5 dg certamente aumenta as chances de recrutamento destas células para a interface materno-fetal e sua participação na expressão de moléculas pró e anti-inflamatórias (TH1/TH2) e nos mecanismos de tolerância que irão facilitar o processo de implantação embrionária.

Concluindo, nossos estudos mostraram a expressão de Ccr9 e da integrina $\alpha 4\beta 7$ em diferentes subpopulações leucitárias, partindo do princípio que a quimiocina Ccl25 atua exclusivamente sobre células que expressam o receptor Ccr9 e que a ativação da integrina $\alpha 4\beta 7$ é importante para esse processo. Neste contexto, observamos flutuações de inúmeras subpopulações, que mesmo em baixas concentrações poderiam atuar de forma relevante para o sucesso gestacional. Dentre essas, a população de células que aumenta sua disponibilidade na circulação, no dia 7,5 de gestação e que tem grandes possibilidade de ser recrutada estão os monócitos F4/80+CD11C-CD11b-CCR9⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺, as células dendríticas linfóides, assim como as células T $\gamma\delta$. No entanto, a presença de leucócitos Ccr9+ na decídua e nas malhas do trofoblasto apenas nos mostra que alguma dessas células ou mesmo todas podem estar sendo recrutadas para funções específicas. Esperamos que estudos futuros em nosso laboratório incluindo a caracterização dos leucócitos Ccr9+ atraídos pelos cones ectoplacentários possam cercear melhor as funções imunológicas desempenhadas pelas células trofoblásticas na medida em que recrutam leucócitos específicos para os sítios de implantação.

Outra função importante que vem sendo atribuída a quimiocinas é uma atividade quimiotática para outros tipos celulares não leucocitários. Evidências mostram determinadas quimiocinas podem modular e direcionar a migração de células trofoblásticas endovasculares humanas, durante o processo de invasão endometrial e remodelação vascular (JOVANOVIĆ et al., 2010; LI et al., 2014). Neste contexto, utilizamos experimentos *in vitro*, para determinar um possível papel de proteína Ccl25 recombinante sobre a atividade das células trofoblásticas. Não foram observadas modificações nos padrões de morte celular por apoptose nem mesmo aumento na capacidade proliferativa das células do cone ectoplacentário. Ensaio de invasão também não mostraram qualquer efeito direto dessa quimiocina na atividade invasiva destas células. O caráter exclusivo dessa quimiocina talvez possa ser uma explicação plausível para esses achados. Entretanto, estudos demonstram que diferentes quimiocinas, exemplo CXCL14, são expressas pelas células trofoblásticas do blastocisto e cone ectoplacentário durante o período de pré e pós implantação. Esta expressão, modula de maneira autócrina/parácrina, o crescimento e a adesão das células trofoblásticas em ensaios *in vitro*. Ainda, esta modulação é, em parte, controlada pela expressão diminuída de MMP 2 e/ou MMP9.

Estas informações são importantes indicativos de um controle autócrino/parácrino, de quimiocinas expressas por células trofoblásticas murinas, regulando a proliferação e invasão dos tecidos maternos durante a implantação (KUANG et al., 2009). Postula-se, também, que a expressão de quimiocinas por células NK uterinas, durante o processo de invasão trofoblástica, induz a morte celular programada de células musculares lisas venosas, regulando e facilitando a remodelação vascular pelas células trofoblásticas (LI et al., 2013).

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que as células trofoblásticas, a partir da produção de Ccl25, podem contribuir para o estabelecimento de um ambiente imunorregulador, por meio do recrutamento de diferentes células imunológicas, participando dessa forma dos mecanismos de manutenção da gestação.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram:

1. A expressão da quimiocina Ccl25 e seu receptor Ccr9 foi pela primeira vez detectada na interface materno-fetal, durante o processo de implantação embrionária em camundongos.
2. A expressão gênica de Ccl25 foi observada durante a fase de pré implantação no endométrio e a imunolocalização mostrou reatividade nas células do epitélio uterino e glandular.
3. Após o início do processo de implantação, a expressão gênica e a imunolocalização de Ccl25 foi encontrada nas células trofoblásticas do blastocisto e do cone ectoplacentário.
4. O receptor Ccr9 foi imunolocalizado em leucócitos maternos presentes no endométrio na fase de implantação, nos vasos e na rede de células do cone ectoplacentário na fase de pós implantação.
5. Reações de imunofluorescência mostraram que células do cone ectoplacentário *in vitro* expressam Ccl25.
6. Ensaios de quimiotaxia mostraram que células trofoblásticas do cone ectoplacentário são capazes de atrair leucócitos assim como 0,5 e 1,0 µg/mL de proteína Ccl25 recombinante. A especificidade deste achado foi indicada por ensaios com silenciamento de Ccl25, o que reduziu esta atração.
7. A atração de leucócitos Ccr9+ foi indicada pela redução na atração de leucócitos quando este receptor foi imunobloqueado.
8. Ensaios *in vitro* sugerem que a proteína Ccl25 recombinante não atua nos processos de proliferação, morte e invasão das células do cone ectoplacentário.

9. A análise das populações de PBMCs-Ccr9+ durante o período periimplantação demonstrou uma maior disponibilidade de determinadas populações de células dendríticas, monócitos e linfócitos T, na circulação periférica.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T. Implantation and decidualization in rodents. **Journal of Experimental Zoology**, v. 266, p. 603-628, 1993.
- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T.; OLIVEIRA, S. Decidua in Rodents. In: GLASSER, S. R.; APLIN, J. D.; GIUDICE, L. C.; TABIBZADESH, S. editors. **The Endometrium**. London: Taylor & Francis, p. 279-93, 2002.
- AGACE, W. W. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 682-692, 2006.
- AIFANTIS, I.; GOUNARI, F.; SCORRANO, L.; BOROWSKI, C.; VON BOEHMER, H. Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca^{2+} mobilization and activation of NF- κ B and NFAT. **Nature Immunology**, v. 2, p. 403-409, 2001.
- AIN, R.; CANHAM, L. N.; SOARES, M. J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. **Developmental Biology**, v. 260, p. 179-190, 2003.
- ALTEVOGT, P.; HUBBE, M.; RUPPERT, M.; LOHR, J.; VON HOEGEN, P.; SAMMAR, M.; ANDREW, D. P.; MCEVOY, L.; HUMPHRIES, M. J.; BUTCHER, E. C. The alpha 4 integrin chain is a ligand for alpha 4 beta 7 and alpha 4 beta 1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n.2, p. 345-355, 1995.
- ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nature Immunology**, v. 5, n. 3, p. 266-271, 2004.
- ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Tolerance, suppression and fetal allograft. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 2, p. 88-96, 2005.
- AMERSI, F. F.; TERANDO, A. M.; GOTO, Y.; SCOLYER, R. A.; THOMPSON, J. F.; TRAN, A. N.; FARIES, M. B.; MORTON, D. L.; HOON, D. S. Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 638-645, 2008.
- AMOROSO, E.C. Endocrinology of pregnancy. **British Medical Bulletin**, v. 11, p.117-125, 1955.
- ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon γ Contributes to Initiation of Uterine Vascular Modification, Decidual Integrity, and Uterine Natural Killer Cell Maturation during Normal Murine Pregnancy. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, p. 259–269, 2000.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 related chemotactic cytokines—CXC and CC chemokines. **Advances in Immunology**, v. 55, p. 97-179, 1994.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BEVILACQUA, E. M.; ABRAHAMSOHN, P. A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. **Archivos de Biología Y Medicina Experimentales**, v. 22, p. 107-18, 1989.
- BLOIS, S. M.; JOACHIM, R.; KANDIL, J.; MARGNI, R.; TOMETTEN, M.; KLAPP, B. F.; ARCK, P. C. Depletion of CD8 Cells Abolishes the Pregnancy Protective Effect of Progesterone Substitution with Dydrogesterone in Mice by Altering the Th1/Th2 Cytokine Profile. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 5893-5899, 2004.
- BLOIS, S. M.; KAMMERER, U.; SOTO, C. A.; TOMETTEN, M. C.; SHAIKLY, V.; BARRIENTOS, G.; JURD, R.; RUKAVINA, D.; THOMSON, A. W.; KLAPP, B. F.; FERNÁNDEZ, N.; ARCK, P. C. Dendritic cell: key to fetal tolerance? **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 4, p. 590-598, 2007.
- BLOIS, S. M.; ALBA, S. C. D.; TOMETTEN, M.; KLAPP, B. F.; MARGNI, R. A.; ARCK, P. C. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1018-23, 2004.
- BORRONI, E. M.; BONECCHI, R.; BURACCHI, C.; SAVINO, B.; MONTOVANI, A.; LOCATI, M. Chemokine decoy receptors: new players in reproductive immunology. **Immunological Investigations**, v. 37, n. 5, p. 483-497, 2008.
- BOWEN J. M.; CHAMLEY L.; KEELAN J.A.; MITCHELL M. D. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. **Placenta**, v. 23, n. 4, p. 257-73, 2002.
- BOWEN, J. M.; CHAMLEY, L.; MITCHELL, M. D.; KEEJ, A. Cytokines of the Placenta and Extra-placental Membranes: Biosynthesis, Secretion and Roles in Establishment of Pregnancy in Women Placenta. **Placenta**, v. 23, p. 239–256, 2002.
- BOWMAN, E. P.; KUKLIN, N. A.; YOUNGMAN, K. R.; LAZARUS, N. H.; KUNKEL, E. J.; GREENBERG, H. B.; BUTCHER, E. C. The Intestinal Chemokine Thymus-expressed Chemokine (CCL25) Attracts IgA Antibody-secreting Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 2, p. 269-275, 2002.
- BRIANA, D. D.; BOUTSIKOU, M.; BAKA, S. et al. Perinatal Plasma Monocyte Chemotactic Protein-1 Concentrations in Intrauterine Growth Restriction. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, n. 65032, p. 5, 2007.
- BINGER, T.; STICH, S.; ANDREAS, K.; KAPS, C.; SEZER, O.; NOTTER, M.; SITTINGER, M.; RINGE, J. Migration potential and gene expression profile of human mesenchymal stem cells induced by CCL25. **Experimental Cell Research**, v. 12, p. 022, 2008.
- CAMPBELL D.J.; BUTCHER E. C. Intestinal attraction: CCL25 functions in effector lymphocyte recruitment to the small intestine. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 1079–1081, 2002.
- CAMPBELL, J. J.; PAN, J.; BUTCHER, E. C. Developmental Switches in Chemokine Responses During T Cell Maturation. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 2353-2357, 1999.

CAO, Q.; CHEN, H.; DENG, Z.; YUE, J.; CHEN, Q.; CAO, Y.; NING, L.; LEI, X.; DUAN, E. Genetic deletion of Cxcl14 in mice alters uterine NK cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 435, n. 4, p. 664-670, 2013.

CHA, J.; SUN, X.; DEY, S. K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. **Nature Medicine**, v. 18, p. 1754–1767, 2013.

CHAOUAT, G.; DUBANCHET, S.; LEDÉE, N. Cytokines: important for implantation? **The Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, p. 491–505, 2007.

CHAOUAT, G.; LEDÉE-BATAILLE, N.; DUBANCHET, S.; ZOURBAS S.; SANDRA, O.; MARTAL, J. TH1/TH2. Paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. **International Archives of Allergy and Immunology Journal**, v. 134, n. 2, p. 93-119, 2004.

CLARK, D. A. Tolerance signaling molecules. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 89, p. 36-48, 2005.

COSTA, M. F.; BORNSTEIN, V. U.; CANDÉA, A. L.; HENRIQUES-PONS, A.; HENRIQUES, M. G.; PENIDO, C. CCL25 induces $\alpha_4\beta_7$ integrin-dependent migration of IL-17⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes during an allergic reaction. **European Journal of Immunology**, v. 42, p. 1250-1260, 2012.

CROSS, J. C.; HEMBERGER, M.; LU, Y.; NOZAKI, T.; WHITELEY, K.; MASUTANI, M.; ADAMSON, S. L. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 187, n.1-2, p. 207-212, 2002.

CROSS, J. C.; WERB, S. J.; FISHER, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, n. 5190, p. 1508-1518, 1994.

CROY, B. A.; CHEN, Z.; HOFMANN, A. P.; LORD, E. M.; SEDLACEK, A. L.; GERBER, S. A. Imaging of vascular development in early mouse decidua and its association with leukocytes and trophoblasts. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 125, 2012.

DEKEL, N.; GNAINSKY, Y.; GRANOT, I.; RACICOT, K.; MOR, G. The role of inflammation for a successful implantation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, n. 2, p. 141-147, 2014.

DENISON, F. C.; RILEY, S. C.; WATHEN, N. C.; CHARD, T.; CALDER, A. A.; KELLY, R. W. Differential concentrations of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 within the fluid compartments present during the first trimester of pregnancy. **Human Reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2292-2295, 1998.

DEY, S. K.; LIM, H.; SANJOY, K. D.; REESE, J.; PARIA, B. C.; DAIKOKU, T.; WANG, H. Molecular Cues to Implantation. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 3, p. 341–373, 2013.

DIMITRIADIS, E.; WHITE, C. A.; JONES, R. L.; SALAMONSEN, L. A. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. **Human Reproduction Update**, Vol.11, n.6, p. 613–630, 2005.

DIMITRIADIS, E.; NIE, G.; HANNAN, N. J.; PAIVA, P.; SALAMONSEN, L. A. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2-3, p. 313-322, 2010.

DOMINGUEZ, F.; PELLICER, A.; SIMON, C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface--a review. **Placenta**, v. 24(Suppl B), p. 48-55, 2003.

DOMINGUEZ, F.; YANEZ-MO, M.; SANCHEZ-MADRID, F.; SIMON, C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players. **FASEB Journal**, v. 19, p. 1056–1060, 2005.

DRAKE, P. M.; GUNN, M. D.; CHARO, I. F.; TSOU, C. L.; HUANG, L.; FISCHER, S. J. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 10, p. 1199-1212, 2001.

Du, M. R.; Wang, S. C.; Li, D. J. The integrative roles of chemokines at the maternal-fetal interface in early pregnancy. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 11, n. 5, p. 438-448, 2014.

EDELE, F.; MOLENAAR, R.; GU"GLE, D.; DUDDA, J. C.; JAKOB, T.; HOMEY, B.; MEBIUS, R.; HORNEF, M.; MARTIN, S. F. Cutting Edge: Instructive Role of Peripheral Tissue Cells in the Imprinting of T Cell Homing Receptor Patterns. **The Journal of Immunology**, v. 181, P. 3745–3749, 2008.

ELLIOT, C. L.; KELLY, R. W.; CRITCHLEY, H. O.; RILEY, S. C.; CALDER, A. A. Regulation of interleukin 8 production in the term human placenta during labor and by antigestagens: **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, 179, 215–220, 1998.

ERICSSON, A.; ARYA, A.; AGACE, W. CCL25 enhances CD103-mediated lymphocyte adhesion to E-cadherin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1029, p.334-336, 2004.

ERICSSON, A.; SVENSSON, M.; ARYA, A.; AGACE, W. CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. **European journal of immunology**, v. 34, p. 2720-2729, 2004.

FERNEKORN, U.; KRUSE, A. Regulation of leukocyte recruitment to the murine maternal/fetal interface. **Chemical Immunology and Allergy**, v.89, p. 105-117, 2005.

FRACCAROLI, L.; ALFIERI, J.; LEIROS, C. P.; RAMHORST, R. Immunomodulatory effects of chemokines during the early implantation window. **Frontiers on Bioscience**, v. 1, p. 288-298, 2009.

HANNA, J.; WALD, O.; GOLDMAN-WOHL, D.; PRUS, D.; MARKEL, G.; GAZIT, R. et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. **Blood**, v. 102, n. 5, p. 1569-1576, 2003.

HANNAN, N. J.; JONES, R. L.; WHITE, C. A.; SALAMONSEN, L.A. The Chemokines, CX3CL1, CCL14 and CCL4, Promote Human Trophoblast Migration at the Fetal-Maternal Interface. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 896-904, 2006.

HANNAN, N. J.; SALAMONSEN, L. A. CX3CL1 and CCL14 Regulate Extracellular Matrix and Adhesion Molecules in the Trophoblast: Potential Roles in Human Embryo Implantation. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 58–65, 2008.

HEDRICK, J.; ZLOTNIK, A. Chemokines and lymphocyte biology. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 343–347, 1996.

HEIKKINEN, J.; MOTTONEN, M.; KOMI, J.; ALANEN, A.; LASSILA, O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. **Clinical Experimental Immunology**, v. 131, p. 498–505, 2003.

HICKEY, D. K.; FAHEY, J. V.; WIRA, C. R. Mouse estrous cycle regulation of vaginal versus uterine cytokines, chemokines, α - β -defensins and TLRs. **Innate Immunity**, v. 19, n. 2, p. 121–131, 2013.

HOSHIDA, M. S.; GORJAO, R.; LIMA, C.; DAHER, S.; CURI, R.; BEVILACQUA, E. Regulation of gene expression in mouse trophoblast cells by interferon-gamma. **Placenta**, v. 28, p. 1059-1072, 2007.

HOSOE, N.; MIURA, S.; WATANABE, C.; TSUZUKI, Y.; HOKARI, R.; OYAMA, T.; FUJIYAMA, Y.; NAGATA, H.; ISHII, H. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninflamed intestinal mucosa. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, p. 458-466, 2004.

HU, D.; CROSS, J. C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2-3, p. 341-354, 2010.

JONES, R. L.; HANNAN, N. J.; KAITU'U, T. J.; ZHANG, J.; SALAMONSEN, L. A. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 6155–6167, 2004.

JOVANOVIĆ, M.; STEFANOSKA I.; RADOJČIĆ L.; VIČOVAC L. Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins α 5 and β 1. **Reproduction**, v. 139, n. 4, p. 789-798, 2010.

KEELAN, J. A.; MARVIN, K. W.; SATO, T. A.; COLEMAN, M.; MCCOWAN, L. M. E.; MITCHELL, M. D. Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 181, p. 1530–1536, 1999.

KING, A.; ALLAN, D. S.; BOWEN, M.; POWIS, S. J.; JOSHEP, S.; VERMA, S. et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. **Blood**, v. 30, n. 6, p. 1623-1631, 2000.

KUANG, H.; CHEN, Q.; FAN, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; PENG, H.; CAO, Y.; DUAN, E. CXCL14 inhibits trophoblast outgrowth via a paracrine/autocrine manner during early pregnancy in mice. **Journal of Cell Physiology**, v. 22, n. 2, p. 448-457, 2009.

KAMMERER, U.; SCHOPPET, M.; MCLELLAN, A. D.; KAPP, M.; HUPPERTZ, H.-I.; KAAMPGEN, E.; DIETL, J. Human decidua contains potent immunostimulatory CD831 dendritic cells. **American Journal of Pathology**, v. 157, p. 159–169, 2000.

LAHAM, N.; BRENNECKE, S. P.; RICE, G. E. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effects of gestation, labor, and chorioamnionitis. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 3, p. 823-827, 1999.

Langenkamp, A.; Messi, M.; Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and non polarized T cells. **Nature Immunology**, v.1, p. 311–316, 2000.

LEHMANN, J.; HUEHN, J.; DE LA ROSA, M.; MASZYNA, F.; KRETSCHMER, U.; KRENN, V.; BRUNNER, M.; SCHEFFOLD, A.; HAMANN, A. Expression of the integrin alpha E beta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n. 20, p. 13031-1306, 2002.

LI, C. M.; HOU, L.; ZHANG, H.; ZHANG, W. Y. CCL17 Induces Trophoblast Migration and Invasion by Regulating Matrix Metalloproteinase and Integrin Expression in Human First-Trimester Placenta. **Reproductive Sciences**, p. 1-13, 2014.

LI, M.; NICOLE M.J. SCHWERBROCK, N. M. J.; LENHART, P. M.; FRITZ-SIX, K. L.; KADMIEL, M. et al. Fetal-derived adrenomedullin mediates the innate immune milieu of the placenta. Fetal-derived adrenomedullin mediates the innate immune milieu of the placenta. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, p. 2408-2420, 2013.

LUMENG, C. N.; DEYOUNG, S. M.; SALTIEL, A. R. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport Proteins. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 1, e166-174, 2007.

LUSTER, A. D.; Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 436–445, 2008.

LUTZ, M.; SCHULER, G. Immature, semi-immature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? **Trends in Immunology**, v. 23, p. 445–449, 2002.

MADEJA, Z.; YADI, H.; APPS, R.; BOULENOUAR, S.; ROPER, S. J.; GARDNER, L. et al. Paternal MHC expression on mouse trophoblast affects uterine vascularization and fetal growth. **PNAS**, v. 108, n. 10, p. 4012-4017, 2011.

MADIGAN, J.; FREEMAN, D. J.; MENZIES, F.; FORROW, T.; NELSON, S. M.; YOUNG, A. et al. Chemokine Scavenger D6 Is Expressed by Trophoblasts and Aids the Survival of Mouse Embryos Transferred into Allogeneic Recipients. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 3202-3212, 2010.

Maldonado-Lopez, R. M.; Smedt, T. D.; Michel, P.; Godfroid, J.; Pajak, B.; Heirman, C. CD8a1 and CD8a2 subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 587–592 1999.

MARSAL, J.; AGACE, W. W. Targeting T-cell migration in inflammatory bowel disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 5, p. 411-429, 2012.

MCKENZIE, G. J.; EMSON, C. L.; BELL, S. E.; ANDERSON, S.; FALLON, P.; ZURAWSKI, G. Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. **Immunity**, v. 9, p. 423–432, 1998.

MCMASTER, M. T.; DEY, S. K.; ANDREWS, G. K. Association of monocytes and neutrophils with early events of blastocyst implantation in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, V. 99, P. 561–569, 1993.

MOSSMAN, H. W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Contributions to Embryology**, v. 26, p. 133-246, 1937.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **TRENDS in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 1471-1490, 2004.

MÜNTENER, M.; HSU, Y. Development of trophoblast and placenta of the mouse. **Acta Anatomica**, v. 98, p. 241-52, 1977.

NORMENT, A. M.; BOGATZKI, L. Y.; GANTNER, B. N.; BEVAN, M. J. Murine CCR9, a Chemokine Receptor for Thymus-Expressed Chemokine That Is Up-Regulated Following Pre-TCR Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 639-648, 2000.

PALS, S. T.; GORTER, D. J. J.; SPAARGAREN, M. Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. **Blood**, v.110, n.9, p. 3102-3111, 2007.

PARMO-CABAÑAS M.; BERNAL D. G.; VERDUGO R. G.; KREMER L.; MÁRQUEZ G.; TEIXIDO J. Intracellular signaling required for CCL25-stimulated T cell adhesion mediated by the integrin $\alpha 4\beta 1$. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, p. 380-391, 2007.

PIALI, L.; HAMMEL, P.; UHEREK, C.; BACHMANN, F.; GISLER, R. H.; DUNON, D.; IMHOF, B. A. CD31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha v \beta 3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. **Journal of Cell Biology**, v. 130, n. 2, p. 451-460, 1995.

PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L. Mathias Duval on Placental Development in Mice and Rats. **Placenta**, v.27, p. 109-118, 2006.

POTTS, D. M. The ultrastructure of implantation in the mouse. **Journal of Anatomy**, v. 103, p. 77–90, 1968.

PULENDRAN, B.; SMITH, J. L.; CASPARY, G.; BRASEL, K.; PETTIT, D.; MARASKOVSKY, E.; MALISZEWSKI, C. R. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **PNAS**, V. 96, P.1036–1041, 1999.

RED-HORSE, K.; ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; PRAKOBPHOL, A.; FOULK, R.; MCMASTER, M.; FISHER, S. J. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 744–754, 2004.

RIBEIRO, R. F. **Estabelecimento de um modelo de gestação complicada por diabetes do tipo 1 em camundongos: avaliação do seu impacto sobre o ambiente uterino no início da gestação**. 2011 170 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RIVERA-NIEVES, J.; HO, J.; BAMIAS, G.; IVASHKINA, N.; LEY K.; OPPERMAN, M.; COMINELLI, F. Antibody Blockade of CCL25/CCR9 Ameliorates Early but not Late Chronic Murine Ileitis. **Gastroenterology**, v.131, p. 1518-1529, 2006.

Rough, R. The mouse—reproduction and development. Minneapolis: **Burgess Publishing Company**; 1968.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance priming and chronic inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 611–614, 2002.

SANTONI, A.; CARLINO, C.; STABILE, H.; GISMONDI, A. Mechanisms underlying recruitment and accumulation of decidual NK cells in uterus during pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 5, p. 417-424, 2008.

SCHALL, T. J.; BACON, K. B. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v.6, p. 865–873, 1994.

SCHMINKEY, D. L.; GROER, M. Imitating a stress response: a new hypothesis about the innate immune system's role in pregnancy. **Medical Hypotheses**, V. 86, N. 6, P. 721-729, 2014.

SCIMONE, M. L.; AIFANTIS, I.; APOSTOLOU, I.; BOEHMER, H. V.; ADRIAN, U. H. V. A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. **PNAS**, v. 103, n.18, p. 7006-7011, 2006.

SHARKEY, A. M.; SMITH, S. K. The endometrium as a cause of implantation failure. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, p. 289-307, 2003.

SHIMOYA, K.; MATSUZAKI, N.; SAWAI, K.; SAJI, F.; MURATA, Y.; YASUMOTO, K.; SU,

S.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Regulation of placental monocyte chemotactic and activating factor during pregnancy and chorioamnionitis. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 393–400, 1998.

SILVA-SANTOS, B. Driving IL-17⁺ $\gamma\delta$ T-cell migration in allergic reactions: a new "inflammatory" role for the "homeostatic" chemokine CCL25. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 5, p. 1097-1101, 2012.

SIMMONS, D. G.; CROSS, J. C. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. **Developmental Biology**, v. 284, n. 1, p. 12-24, 2005.

SONG, H.; HAN, K.; LIM, H. Progesterone supplementation extends uterine receptivity for blastocyst implantation in mice. **Reproduction**, v. 133, n.2, p. 487-493, 2007.

STENSTAD, H.; SVENSSON, M.; CUCAK, H.; KOTARSKY, K.; AGACE, W. W. Differential homing mechanisms regulate regionalized effector CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T cell accumulation within the small intestine. **PNAS**, V. 104, N. 24, 10122-10127, 2007.

SUN, H.; LIU, S.; ZHENG, Y. J.; PAN, Y. D.; ZHANG, K.; CHEN, J. F. Distinct Chemokine Signaling Regulates Integrin Ligand Specificity to Dictate Tissue-Specific Lymphocyte Homing. **Developmental Cell**, v. 30, p. 61-70, 2014.

SVENSSON, M.; MARSAL, J.; ERICSSON, A.; CARRAMOLINO, L.; BRODÉN, T.; MÁRQUEZ, G.; AGACE, W. W. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 lymphocytes to the small-intestinal mucosa. **The Journal of Clinical Investigation**, v.110, n. 8, p. 1113-1121, 2002.

TEOH, P. J.; MENZIES, F. M.; HANSELL, C. A.; CLARKE, M.; WADDELL, C.; BURTON, G. J.; NELSON, S. M.; NIBBS, R. J. Atypical chemokine receptor ACKR2 mediates chemokine scavenging by primary human trophoblasts and can regulate fetal growth, placental structure, and neonatal mortality in mice. **Journal of Immunology**, v. 193, n. 10, p. 5218-5228, 2014.

TERNESS, P.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G.; RABINOVICH, G. A.; SAITO, S.; CLARK D. A. Tolerance signaling molecules and pregnancy: IDO, galectins, and the renaissance of regulatory T cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 58, n. 3, p. 238-254, 2007.

UEHARA, S.; FARBER, J. M.; LOVE, P. E. Characterization of CCR9 Expression and CCL25/Thymus-Expressed Chemokine Responsiveness During T Cell Development: CD3^{high}CD69⁺ Thymocytes and $\gamma\delta$ TCR⁺ Thymocytes Preferentially Respond to CCL25. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 1, p. 134-42, 2002.

VICARI, A. P.; FIGUEROA, D. J.; HEDRICK, J. A.; FOSTER, J. S.; SINGH, K. P.; MENON, S.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. K.; BACON, B. A.; ZLOTNIK, A. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. **Immunity**, v. 7, p. 291, 1997.

WANG, H.; DEY, S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 185-199, 2006.

WHITE, G. E.; IQBAL, A. J.; GREAVES, D. R. CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation -Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. **Pharmacology Reviews**, v. 65, p. 47–89, 2013.

WHITE, C. A.; DIMITRIADIS, E.; SHARKEY, A. M.; SALAMONSEN, L. A. Interleukin-11 inhibits expression of insulin-like growth factor binding protein-5 mRNA in decidualizing human endometrial stromal cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 9, p. 649-658, 2005.

WILKINSON, B.; OWEN, J. J. T.; JENKINSON, E. J. Factors Regulating Stem Cell Recruitment to the Fetal Thymus. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 3873-3881, 1999.

WOOD, G. W.; HAUSMANN, E. H. S.; KANAKARAJ, K. Expression and regulation of chemokine genes in the mouse uterus during pregnancy. **Cytokine**, v. 11, n. 12, p. 1038–1045, 1999.

WURBEL, M. A.; MCINTIRE, M. G.; DWYER, P.; FIEBIGER, E. CCL25/CCR9 Interactions Regulate Large Intestinal Inflammation in a Murine Model of Acute Colitis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, e16442, 2011.

WURBEL, M. A.; MALISSEN, M.; GUY-GRAND, D.; MEFFRE, E.; NUSSENZWEIG, M. C.; RICHELME, M.; CARRIER, A.; MALISSEN, B. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2626-2632, 2001.

YIP, K. S.; SUVOROV, A.; CONNERNEY, J.; LODATO, N. J.; WAXMAN, D. Changes in mouse uterine transcriptome in estrus and proestrus. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 13, p. 1-12, 2013.

YOSHINAGA, K. A sequence of events in the uterus prior to implantation in the mouse. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 1017–1022, 2013

YOSHINAGA, K. Research on Blastocyst Implantation Essential Factors (BIEFs). **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, p. 413–424, 2010.

Yuan, J. X.; Xiao, L. J.; Lu, C. L.; Zhang, X. S.; Liu, T.; Chen, M.; Hu, Z. Y.; Liu, Y. X. Expression and regulation of heat shock protein105 in rat uterus during embryo implantation. **(Comunicação Pessoal)**, 2008.

ZABALLOS, A.; GUTIÉRREZ, J.; VARONA, R.; ARDAVIN, C.; MÁRQUEZ, G. Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 10, p. 5671-5675, 1999.

ZARNANI, A-H.; MOAZZENI, S-M.; SHOKRI, F.; MOJDEH, S. Kinetics of murine decidual dendritic cells. **Reproduction**, v. 133, p. 275–283, 2007.

ZENCLUSSEN, A. C. CD4(+)CD25+ T regulatory cells in murine pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 2, p. 101–110, 2005.

ZENCLUSSEN, A. C.; FEST, S.; SEHMSDORF, U. S.; HAGEN, E.; KLAPP, B. F.; ARCK, P. C. Upregulation of decidual P-selectin expression is associated with an increased number of Th1 cell populations in patients suffering from spontaneous abortions. **Cell Immunology**, v.213, n. 2, p. 94-103, 2001.

Ziu, L.J.; Bagciii, M. K.; Bagciii, I. C. Attenuation of calcitonin gene expression in pregnant rat uterus leads to a block in embryonic implantation. **Endocrinology**, v. 139, p. 330-339, 1998.

ZHOU, C.; WU, J.; BORILLO, J.; TORRES, L.; MCMAHON, J.; BAO, Y.; LOU, Y. H. Transient expression of CC chemokine TECK in the ovary during ovulation: its potential role in ovulation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 5, p. 238-248, 2005.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and the irrolein immunity. **Immunity**, v. 12, p. 121–127, 2000.