Alexandre Urban Borbely

**A influência do biglicam mediada por receptores do
tipo Toll-like 2 e 4 no processo de invasão das
células trofoblásticas**

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

São Paulo
2013

Alexandre Urban Borbely

**A influência do biglicam mediada por receptores do
tipo Toll-like 2 e 4 no processo de invasão das
células trofoblásticas**

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

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Profa. Dra. Estela Bevilacqua

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Borbely, Alexandre Urban.

A influência do biglicam mediada por receptores do tipo Toll-like 2 e 4 no processo de invasão das células trofoblásticas / Alexandre Urban Borbely. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Estela Maris Forell Andrade 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: Citofisiologia do trofoblasto.

Versão do título para o inglês: The influence of biglycan mediated by Toll-like receptors 2 and 4 in the invasion of trophoblast cells.

1. AKT 2. Biglicam 3. TLR-2 4. TLR-4 5. Invasão 6. Trofoblasto extraviloso I. Bevilacqua, Profa. Dra. Estela Maris Forell Andrade II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0143/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alexandre Urban Borbely.

Título da Tese: A influência do biglicam mediada por receptores do tipo Toll-like 2 e 4 no processo de invasão das células trofoblásticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Estela Maris Forell Andrade 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) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 08 de junho de 2010.

PARECER 943/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 26.05.2010 **APROVOU** o projeto intitulado: *"A influência do biglicam mediada por receptores do tipo Toll-like 2 e 4 no processo de invasão pelas células trofoblásticas"* sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **ESTELA BEVILACQUA** e o aluno **ALEXANDRE URBAN BORBELY**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.05.2011**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

São Paulo, 24 de maio de 2010.

À Câmara de Pesquisa da Comissão de Ensino e Pesquisa e
Ao Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

Prezados Senhores,

O projeto de pesquisa *“A influência do biglicam mediada por receptores do tipo Toll-like 2 e 4 no processo de invasão citotrofoblástica”* cuja investigadora principal é a Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua, a ser realizado nas dependências do Hospital Universitário da USP (HU/USP), foi considerado exequível pela Divisão de Clínica Obstétrica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

[Como a investigadora principal não pertence ao HU/USP, e não havendo outro participante no estudo pertencente ao quadro de profissionais do Hospital, o responsável pelo projeto de pesquisa na área será o Dr. Rodrigo Ruano].

Declaro que esta Diretoria e o responsável pelo projeto têm conhecimento dos procedimentos da Universidade de São Paulo no que se refere à excelência científica exigida, às características da revisão anônima por pares e aos termos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas Resoluções complementares.

Nestes termos, estaremos sempre à disposição da Câmara de Pesquisa e do Comitê de Ética em Pesquisa para dirimir qualquer dúvida que surja no decorrer da análise do presente projeto.

Atenciosamente,

PROF. DR. MARCELO ZUGAIB
Diretor Técnico da Divisão de Clínica Obstétrica
Hospital Universitário da USP
Nº USP: 70124

À minha família e noiva, os quais foram, são e sempre serão minha prioridade e que, após viver nove meses longe, pude perceber como a simples presença deles me faz ser uma pessoa mil vezes melhor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ladislau Borbely e Maria Lucia Urban Borbely, por todo o amor, carinho e apoio em toda a empreitada desde a iniciação científica até hoje, e por todos os seus ensinamentos, sem os quais eu não conseguiria ser metade do que sou hoje;

Ao meu irmão Artur Urban Borbely, meu melhor amigo e motivo de orgulho, por ser uma pessoa tão inspiradora de tantas maneiras e pela sua índole mais que perfeita;

Aos meus avôs Alcindo Urban, Rosa Victoria Bidarra Urban e Ester Borbely e aos meus padrinhos Osmar de Carvalho e Fátima Isabel Urban de Carvalho, por todo apoio e carinho em momentos cruciais do Doutorado;

Em memória ao meu avô Laszlo Borbely e ao meu tio-avô Tibor Borbely, gostaria que eles pudessem ter visto o neto virar doutor;

À minha noiva Karen Steponavicius Piedade Cruz, uma parceira no trabalho e no amor, ajudando em experimentos e em momentos fáceis e difíceis da minha vida no Brasil e na Áustria, me fazendo mais feliz a cada segundo que passo a seu lado;

À minha orientadora Profa. Dra. Estela Bevilacqua, por ter me acolhido de braços abertos em seu laboratório desde minha iniciação científica até hoje, pelo seu contagiante espírito de pesquisa e por ter participado de meu processo de formação profissional de maneira positiva;

À Rosângela Augusto Farias, técnica do laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto, pelos ensinamentos valiosos e por sempre ter me ajudado, acolhendo de forma gentil e solidária sempre que precisei;

A todos os meus colegas de laboratório: estagiários, pós-graduandos e pós-doutorandos do Laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto, pela amizade e por toda a ajuda que sempre precisei, em especial para Rodrigo Barbano Weingrill, Alex Gomes da Silva e Karen Matias do Prado por suas contribuições valiosas.

À Dra. Silvana Sandri, pós-doutoranda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, minha grande parceira de pesquisa, pela sua inestimável contribuição ao meu Doutorado e aos nossos trabalhos em conjunto;

À Profa. Dra. Ana Campa e todos os alunos e técnicos do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela inestimável ajuda em momentos críticos do trabalho;

À Isabela Rodrigues Fernandes do Departamento de Cirurgia da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela ajuda nas coletas de placentas a termo e na padronização da cultura de EVT;

Ao Prof. Dr. Sérgio Ferreira de Oliveira, por todos os conselhos valiosos, por sempre acreditar em meu potencial e pela amizade construída;

Ao meu co-orientador austríaco Martin Knöfler, pela oportunidade única de trabalhar em seu grupo de pesquisa, me ensinando inúmeras lições que nunca esquecerei e que pretendo aplicar na minha vida acadêmica;

Ao Prof. Dr. Jürgen Pollheimer e aos técnicos Peter Haslinger, Güdrun Meinhardt e Sandra Haider da Unidade de Biologia Reprodutiva da Universidade Médica de Viena, por terem ajudado imensamente em meu Doutorado;

Für meine post-grad Kollegen auf die Feto-Maternale Medizin auf die Medizinische Universität Wien: Philipp Velicky, Gerlinde Otti, Valerie Fock, und in speziell, Katarzyna Biadasiewicz, die wichtige Beiträge, in Labor lernen und meines österreichisches Lebens helfen.

Für alle Freunde ausserhalb des Labors, die ich während meines österreichisches Lebens kennen gelernt habe: Thomas, Daniele, Sabine, René, Jakob, Melitta, Marc, Malina und für alle, die zu meinem persönlichen und beruflichen Wachstum positiv beigetragen haben und die mir die ganze Zeit während meines Aufenthaltes in Wien unschätzbar geholfen haben. Große Küsse und vielen Dank!

Às minhas amigas, Luciana e Juliane, por todos os momentos agradáveis e pela forte e duradoura amizade que cultivamos desde a época que eu ainda tinha cabelo;

Às secretárias Celiana, Eloísa e Regina, agradeço pelo auxílio e presteza em todos os momentos que precisei;

Aos funcionários da Biblioteca do ICB, que trabalham com dedicação, presteza e eficiência, em especial para Mônica, pela revisão textual;

À Coordenadoria do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual, por todo o apoio concedido e pelo aprendizado que tive enquanto fui representante discente;

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro em território brasileiro e à CAPES, pelo PDSE concedido;

A todos que não foram aqui citados, mas que de alguma maneira me influenciaram em decisões, me apoiaram e incentivaram, ficam meus sinceros agradecimentos.

*Eu vou achar um caminho ou então
vou fazer um.*

Hannibal Barca

RESUMO

Borbely AU. A influência do biglicam mediada por receptores do tipo Toll-like 2 e 4 no processo de invasão das células trofoblásticas. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O biglicam é um membro da família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina e é altamente expresso em células trofoblásticas de patologias placentárias com invasividade exacerbada. No entanto, os papéis biológicos do biglicam no trofoblasto ainda não foram elucidados. Neste trabalho, verificamos a localização e a expressão de biglicam em placentas de primeiro trimestre, de termo e em culturas primárias, assim como também foram analisadas suas funções na motilidade, proliferação e sinalização trofoblásticas. Imunofluorescência das vilosidades coriônicas e da decidua basal revelaram expressão de biglicam e seus receptores *Toll-like* (TLR)-2 e TLR-4 em todos os subtipos de células trofoblásticas, embora em placentas a termo o biglicam não apresentou-se expresso em células do citotrofoblasto extraviloso (CTEV). A análise por citometria de fluxo indicou a expressão de biglicam e os TLRs na superfície celular de células SGHPL-5. Similarmente, a co-expressão de HLA-G1 com biglicam ou os TLRs, respectivamente, foi observada em células CTEV de primeiro trimestre. Análise por Western Blot confirmou a expressão de biglicam e dos TLRs em lisados de placenta e CTEV de primeiro trimestre, assim como em células SGHPL-5. Tanto o biglicam solúvel quanto o recombinante foram capazes de promover migração e invasão de células SGHPL-5 e de CTEV de primeiro trimestre e de termo, enquanto a proliferação não foi afetada. Além disso, o biglicam estimulou a fosforilação de AKT nos sítios Thr308 e Ser473 nas células trofoblásticas, mas não promoveu ativação de ERK, NFkB ou sinalização por EGF-R. A migração e a invasão biglicam-dependentes e as fosforilações de AKT foram especificamente inibidas após a adição de anticorpos bloqueadores anti-TLR-2 e anti-TLR-4. Finalmente, o silenciamento gênico de AKT1 em células SGHPL-5 usando um *small-hairpin* microRNA aboliu os efeitos do biglicam na motilidade trofoblástica. Em conclusão, o biglicam é capaz de aumentar a motilidade de células trofoblásticas de primeiro trimestre e de termo após sinalização por AKT através da ativação de TLR-2 e TLR-4.

Palavras-chave: AKT. Biglicam. TLR-2. TLR-4. Invasão. Trofoblasto extraviloso.

ABSTRACT

Borbely AU. The influence of biglycan mediated by Toll-like receptors 2 and 4 in the invasion of trophoblast cells. [Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Biglycan, a member of the family of small leucine-rich proteoglycans, was shown to be highly expressed in trophoblasts from highly invasive placental pathologies. However, the biological role of biglycan in trophoblasts has not been elucidated. Here, localization and expression of biglycan in first trimester and term placental tissues and cultures, as well as its function in trophoblast motility, proliferation and signalling were analyzed. Immunofluorescence of chorionic villi and basal decidual sections revealed expression of biglycan and its putative receptors, Toll-like receptor (TLR)-2 and -4 in all subtypes of cytotrophoblasts, although at term, biglycan was not expressed in extravillous cytotrophoblasts (EVT). Flow cytometry indicated expression of biglycan and the TLRs at the cell surface of trophoblastic SGHPL-5 cells. Similarly, co-expression of HLA-G1 with biglycan and the TLRs, respectively, was noticed in flow cytometry analyses of first trimester EVT. Western blot analyses confirmed biglycan and TLRs expression in placental tissue, EVTs and SGHPL-5 cells. Purified as well as recombinant biglycan promoted migration and invasion of SGHPL-5 cells, first trimester and term EVT, whereas cell proliferation was not affected. Moreover, biglycan stimulated phosphorylation of AKT at Thr308 and Ser473 in both SGHPL-5 cells and EVT, but did not promote activation of ERK, NFkB, or EGF receptor-dependent signaling. Biglycan-dependent migration, invasion and phosphorylation of AKT were specifically inhibited upon addition of TLR -2 or TLR-4 blocking antibodies. Finally, gene silencing of AKT1 in SGHPL-5 cells using a small-hairpin microRNA, abolished the stimulatory effects of biglycan on trophoblast invasion. In conclusion, biglycan increases motility of first trimester and term trophoblasts by promoting AKT signaling through activation of TLR-2 and TLR-4.

Keywords: AKT. Biglycan. TLR-2. TLR-4. Extravillous trophoblast. Invasion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Morfologia geral das células isoladas e cultivadas a partir da placa basal decidual de placentas a termo	64
Figura 2- Caracterização e pureza das células isoladas e cultivadas a partir da placa basal decidual de placentas a termo por 48 h	66
Figura 3- Viabilidade celular e expressão de mRNA em células EVT de placa basal decidual de placentas a termo em diferentes tempos de cultura	68
Figura 4- Capacidade invasiva das células EVT de placa basal decidual de placentas a termo por 48 h	70
Figura 5- Imunofluorescência para biglicam, TLR-2 e TLR-4 em vilosidades coriônicas de placentas de primeiro trimestre	73
Figura 6- Imunofluorescência para biglicam, TLR-2 e TLR-4 em placa basal decidual de placentas de primeiro trimestre	75
Figura 7- Imuno-histoquímica para biglicam, TLR-2 e TLR-4 em vilosidades coriônicas e em placa basal decidual de placentas a termo	77
Figura 8- Imunofluorescência para biglicam, TLR-2 e TLR-4 em células SGHPL-5, EVT de placentas de primeiro trimestre e EVT de placentas a termo	80
Figura 9- Expressões de biglicam, TLR-2 e TLR-4 em células trofoblásticas	82
Figura 10- Análise da proliferação de células EVT de primeiro trimestre duplo-positivas para CK-7 e BrDU, tratadas ou não com biglicam solúvel e tratadas ou não com anticorpos anti-TLR-2 ou anti-TLR-4	87
Figura 11- Análise da motilidade de células SGHPL-5	89
Figura 12- Análise da motilidade de células EVT	91
Figura 13- Expressão por Western Blot de ERK 1/2 total e fosforilada em células SGHPL-5 tratadas com biglicam solúvel por diferentes períodos	93
Figura 14- Imunofluorescência para NFkB p65 fosforilada em células SGHPL-5 ...	95
Figura 15- Expressão de AKT total e fosforilada em Thr308 e em Ser473	97
Figura 16- Expressão de EGF-R fosforilado em células SGHPL-5 tratadas com biglicam solúvel por diferentes períodos	99
Figura 17- Expressão de AKT total e fosforilada em Thr308 e em Ser473 em células SGHPL-5 tratadas com biglicam solúvel e acrescidas de anticorpos anti-TLR-2 ou anti-TLR-4	102
Figura 18- Análise da invasão de células SGHPL-5 shRNAmir e shRNAmir-AKT1 tratadas ou não com biglicam solúvel	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Componentes da família dos SLRP	34
Tabela 2- Análise quantitativa de marcadores de EVT cultivados por 48h	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC – Proteína puntiforme associada à apoptose e contendo domínio CARD

BGN R – Biglicam recombinante

BGN S – Biglicam solúvel

BMP-4 – Proteína morfogenética óssea

BrDU – 5-bromo-2'-desoxiuridina

BSA – Albumina sérica bovina

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CD – *Cluster* de diferenciação

CH – Células de Hofbauer

CK-7 – Citoqueratina-7

CSF – Fator de crescimento estimulador de colônias

CTEV – Citotrofoblasto extraviloso

CTV – Citotrofoblasto viloso

DAB – Tetrahidrocloreto 3'-3-diaminobenzidina

DAMP – Padrões moleculares associados ao perigo

DAP-I – 4',6-diamino-2-fenilindol

DB – Decídua basal

DEC – Célula decidual

DMEM/F12 – Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes F-12

DNA – Ácido desoxirribonucleico

eCTEV – Citotrofoblasto extraviloso endovascular

EDN – Neurotoxina derivada de eosinófilos

EGF – Fator de crescimento epidermal

EGF-R – Receptor do fator de crescimento epidermal

ERK – Kinase reguladora de sinais extracelulares

FBS – Soro fetal bovino

FITC – Fluoresceína isotiocianeto

G – Glândula endometrial

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HBSS – Solução salina balanceada de Hank

hCG – Gonadotrofina coriônica humana
HCl – Ácido clorídrico
HLA-G1 – Antígeno leucocitário humano G1
HMGB-1 – Proteína B1 do grupo de alta motilidade
HSP – Proteína de choque térmico
IFN-γ – Interferon γ
IGF-II – Fator de crescimento similar à insulina II
IL-4 – Interleucina 4
IMDM – Meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove
LRP-6 – Proteína 6 relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade
MD-2 – Antígeno linfocitário 96
MEC – Matriz extracelular
MMP – Metaloproteinases
MR – Receptor endocítico de manose
mTORC1 – Alvo do complexo 1 da rapamicina em mamíferos
MyD88 – Gene 88 da resposta primária de diferenciação mielóide
NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase
NFκB – Fator nuclear kappa B
NKu – Células *Natural Killer* uterinas
NLRP3 – Família do receptor similar ao NOD contendo domínio *pyrin* 3
PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Tampão fosfato salina
PCR – Reação em cadeia de polimerase
PE – Ficoeritrina
PG – Proteoglicano
PI – Iodeto de propídeo
PI3K – Fosfoinositol 3-kinase
PL-5 – Células SGHPL-5
PIAP – Fosfatase alcalina placentária
PIGF – Fator de crescimento placentário
PRELP – Proteína rica em repetições de prolina/arginina e leucina
PRR – Receptores de reconhecimento de padrões
Rac1 – Substrato 1 da toxina botulínica C3 relacionada a Ras
RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

Runx2 – Fator de transcrição relacionado ao caule de couve

Ser – Serina

shRNAmir – *Short-hairpin* microRNA

SLRP – Pequenos proteoglicanos ricos em leucina

SR-A – Receptor de varredura A

ST – Sinciciotrofoblasto

TCF-4 – Fator de transcrição 4

TGF- β – Fator de crescimento transformador β

Thr – Treonina

TIRP – Proteína relacionada ao TRAP

TLR – Receptor do tipo *Toll-like*

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TRAP – Fosfatase ácida resistente ao tartarato

TRIF – Proteína adaptadora contendo domínio TIR e indutora de IFN- β

TRITC – Tetrametilrodamina-5-6-isotiocianeto

Tyr – Tirosina

VC – Vilosidades coriônicas

Vm – Vimentina

VS – Vaso sanguíneo

WISP-1 – Proteína de indução da via de sinalização Wnt1

Wnt – Sítio de integração relacionado ao *Wingless*

ZnCl₂ – Cloreto de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 A Placenta	27
2.1.1 Aspectos Macroscópicos da Placenta Normal	27
2.1.2 As Vilosidades Coriônicas	27
2.1.3 O Citotrofoblasto Extraviloso	28
2.1.4 A Decídua Basal	29
2.1.5 A Matriz Extracelular Placentária	31
2.1.6 A Invasão Trofoblástica	31
2.2 A Matriz Extracelular	32
2.3 Os Proteoglicanos	32
2.4 Os Pequenos Proteoglicanos Ricos em Leucina	33
2.5 O Biglicam	34
2.5.1 Proliferação, Morte e Sobrevivência	35
2.5.2 Diferenciação	36
2.5.3 Inflamação	36
2.5.4 Migração	36
2.5.5 Sinalização Intracelular	37
2.6 Receptores do tipo <i>Toll-like</i> 2 e 4	38
2.7 Os TLRs na Interface Materno-Fetal	39
3 OBJETIVOS	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Obtenção das Placentas de Primeiro Trimestre de Gestação	44
4.2 Obtenção das Placentas a Termo	44
4.3 Separação de EVT de Primeiro Trimestre de Gestação	45
4.4 Separação de EVT de Placentas a Termo	46
4.5 Cultura das EVT de Primeiro Trimestre e Termo	47
4.6 Caracterização das EVT de Termo	47
4.6.1 Imunofluorescência	47
4.6.2 Citometria de Fluxo	48
4.6.3 Teste de Exclusão por Azul de Trypan	48
4.6.4 Extração de RNA e PCR	49
4.6.5 Ensaios de Invasão	49

4.6.6 Zimografia em Gelatina	50
4.6.7 Documentação Fotográfica e Análise Digital	50
4.6.8 Análises Estatísticas	50
4.7 Cultura da Linhagem Celular SGHPL-5	51
4.8 Construção de um <i>Knockdown</i> Estável de AKT1	51
4.9 Processamento das Placentas para Técnicas Histológicas	51
4.10 Imunofluorescência e Imuno-histoquímica das Placentas	52
4.11 Imunofluorescência das Células EVT e SGHPL-5	53
4.12 Extração Protéica e Western Blot	53
4.13 Citometria de Fluxo	55
4.14 Ensaio de Proliferação	55
4.15 Ensaaios de Migração e Invasão de SGHPL-5	56
4.16 Ensaaios de Invasão das EVT de Primeiro Trimestre	56
4.17 Ensaaios de Invasão das EVT de Termo	57
4.18 Ensaio de Translocação de NFkB	57
4.19 Documentação Fotográfica e Análise Digital	58
4.20 Análise Estatística	58
5 RESULTADOS	60
5.1 Células EVT de Placa Basal de Placentas a Termo como Modelos Experimentais.....	60
5.1.1 Caracterização e Pureza	60
5.1.2 Viabilidade e Expressão de mRNA	61
5.1.3 Atividade das MMPs	62
5.1.4 Propriedades Invasivas	62
5.2 Localização de Biglicam, TLR-2 e TLR-4 em Placentas de Primeiro Trimestre e a Termo	71
5.3 Localização de Biglicam, TLR-2 e TLR-4 em Células SGHPL-5 e EVT de Primeiro Trimestre e de Termo	78
5.4 Efeitos do Biglicam na Proliferação	83
5.5 Efeitos do Biglicam na Migração e Invasão de Células SGHPL-5	83
5.6 Efeitos do Biglicam na Invasão em EVT de Primeiro Trimestre e de Termo	84
5.7 Sinalização Intracelular Induzida por Biglicam	85
5.8 Sinalização Intracelular via AKT Induzida por Ativação de TLR-2 e TLR-4	100
5.9 Invasão Induzida Através de Sinalização Intracelular voa AKT1	100
6 DISCUSSÃO	106
7 CONCLUSÕES	116

REFERÊNCIAS	118
APÊNDICE – Artigo submetido	137

1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão dividido em duas grandes e diferentes estruturas: o córion viloso (parte fetal) e a decídua basal (parte materna). O córion viloso possui suas vilosidades revestidas por trofoblasto (sinciciotrofoblasto em posição mais externa e citotrofoblasto mais internamente), o qual se posiciona sobre o mesênquima embrionário rico em macrófagos (células de Hofbauer) e capilares fetais. Com o desenvolvimento placentário, há uma diminuição da população citotrofoblástica, aumento das vilosidades coriônicas e consequentemente da área de sinciciotrofoblasto, aumento de depósitos de fibrinoide e potencialização das trocas gasosas e de nutrientes, devido ao adelgaçamento da barreira hematoplacentária (Boyd, Hamilton, 1970). A parte materna da placenta é composta por células deciduais, células imunológicas e componentes do sistema vascular arterial e venoso, mas também apresenta um componente de origem fetal: o citotrofoblasto extraviloso.

Durante o processo de implantação embrionária, o sinciciotrofoblasto (ST) invade o estroma uterino e se interpõe entre células endoteliais dos capilares do estroma mais superficial, de modo que esta superfície passa a ser banhada pelo sangue materno, formando uma precoce e rudimentar interface de trocas entre o organismo materno e o embrionário (Boyd, Hamilton, 1970). Em uma segunda onda de invasão, durante a fase de formação da placenta, células do citotrofoblasto viloso (CTV) extrapolam os limites das vilosidades na região de ancoragem com a decídua basal, invadindo este tecido; essas células são denominadas de citotrofoblasto extraviloso (CTEV) (Red-Horse et al., 2004). Essas células exibem intensa atividade invasiva e, nas regiões mais distais da ancoragem das vilosidades, dispersam-se na mucosa endometrial, formando o trofoblasto intersticial (sob a forma de células gigantes multinucleadas ou não). Essas células também são capazes de invadir as artérias espiraladas uterinas, sendo denominadas de citotrofoblasto extraviloso endovascular (eCTEV) e responsáveis pela modulação da estrutura morfológica e das propriedades funcionais dessas artérias (Kaufmann, Castelucci, 1997; Kemp et al., 2002; Loregger et al., 2003). As células CTEV são mais numerosas no primeiro trimestre de gestação, diminuindo nas fases mais tardias; na placenta a termo, essas células são encontradas em menor quantidade e parcialmente substituídas por fibrinóide (Benirschke et al., 2006).

O painel de eventos gênicos e biológicos associados aos mecanismos de invasão do trofoblasto tem sido há muito tempo comparado aos de células

neoplásicas (Corvinus et al., 2003; Xu et al., 2003; Yagel et al., 1990). A relevante diferença, entretanto, é que o processo de invasão trofoblástica é controlado temporal e espacialmente ao longo da gestação, de forma fisiológica. No rol de fatores envolvidos nesta regulação estão incluídos muitos fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, morfógenos e vários componentes da matriz extracelular (MEC), em especial alguns proteoglicanos.

Os proteoglicanos são um grupo heterogêneo de proteínas que se ligam covalentemente a cadeias de glicosaminoglicanos (Iozzo, Murdoch, 1996). Dentre as várias famílias de proteoglicanos, os da família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) tem sido muito estudados recentemente, devido a seus papéis-chave como mediadores de fenômenos celulares, tais como proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração (Fisher, 1999; Kinsella et al., 1997; Moscatello et al., 1998; Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2003). A família dos SLRPs inclui proteoglicanos como o decorin, biglicam, fibromodulina, lumican, epifican e queratocan, entre outros (Schaefer, Schaefer, 2010).

Particularmente de nosso interesse, o biglicam é um proteoglicano composto de duas cadeias de sulfato de condroitina ou de sulfato de dermatana (Fisher et al., 1989), geralmente localizado na superfície celular, pericelularmente, ou ainda ligado a proteoglicanos associados à matriz extracelular (MEC) (Fedarko et al., 1990).

Como outros proteoglicanos, o biglicam possui importantes funções estruturais, como a ligação com diversos tipos de colágenos (Douglas et al., 2006; Wiberg et al., 2002), hidroxiapatita (Zhou, 2007), matrilineas (Wiberg et al., 2003), queratoepitelina (Sciandra et al., 2008), fibronectina (Bidanset et al., 1992) e tropoelastina (Reinboth et al., 2002). Além das funções estruturais, a ligação de biglicam ao fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (Baker et al., 2009; Hildebrand et al., 1994), ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Hayashi et al., 2005; Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2002) e à proteína de indução da via de sinalização Wnt1 (WISP-1) (Inkson et al., 2009) leva a uma inibição funcional das mesmas, enquanto que a ligação do biglicam ao sítio de integração 3a relacionado ao *Wingless* (Wnt3a) (Berendsen et al., 2011) e à proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) (Miyazaki et al., 2008), induz aumento de função das mesmas. Além disso, o biglicam também é conhecido como uma molécula pró-migratória em células endoteliais aórticas (Kinsella et al., 1997), fibroblastos pulmonares (Tufvesson,

Westergren-Thornsson, 2003) e células musculares lisas vasculares (Shimizu-Hirota et al., 2004).

Recentemente, membros da família das SLRPs, como o biglicam, foram estudados quanto às suas expressões diferenciais e funções importantes durante a decidualização de camundongos (San Martin, Zorn, 2003; San Martin et al., 2003). Entretanto, poucos estudos sobre o biglicam na interação materno-fetal em humanos foram conduzidos. O estudo de Murthi e colaboradores (2010) observou a diminuição de biglicam nas vilosidades coriônicas de placentas com restrição de crescimento fetal idiopático em comparação com placentas saudáveis. Outro estudo, conduzido por Borbely e colaboradores (2013), sugere que o biglicam possa ter atividade pró-migratória em células trofoblásticas. Esse estudo mostrou que células CTEV de placentas a termo não apresentam expressão de biglicam, enquanto que células trofoblásticas altamente invasivas de patologias como placenta acreta, mola invasora e coriocarcinoma possuem marcante expressão de biglicam.

Paralelamente às funções celulares, estudos também tem mostrado que o biglicam é capaz de interagir com diferentes receptores tais como: α -dystroglicam (Bowe et al., 2000), receptor de varredura A (SR-A) (Santiago-Garcia et al., 2003), receptor endocítico de manose (MR) (Chieppa et al., 2003), receptores purinérgicos P2X4 e P2X7 (Babelova et al., 2009), receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) (Iacob, Cs-Szabo, 2010) e os receptores do tipo *Toll-like* 2 e 4 (TLR-2 e TLR-4) (Babelova et al., 2009; Derbali et al., 2010; Popovic et al., 2011; Schaefer et al., 2005). Na grande maioria destes trabalhos, o biglicam é apontado como pertencente ao grupo de moléculas denominado de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs); composto por moléculas endógenas liberadas durante dano tecidual e capazes de se ligar a receptores da imunidade inata, gerando uma resposta inflamatória estéril (Matzinger, 2002). Além disso, Babelova e colaboradores (2009) propuseram que o dano tissular ou células ativadas poderiam induzir a liberação de biglicam solúvel; no entanto, os detalhes desse mecanismo não foram ainda estabelecidos, assim como os papéis desempenhados pelo biglicam nessas condições.

Na placenta, TLR-2 e TLR-4 foram identificados em todas as células da linhagem trofoblástica de placentas de primeiro e terceiro trimestres de gestação (Holmlund et al., 2002), sempre associados a processos inflamatórios (Abrahams et al., 2004; Abrahams et al., 2005; Koga, Mor, 2010). Em outros modelos, também foi

mostrado que o biglicam pode atuar sobre TLR-2 e TLR-4 e promover aumento de migração/invasão (Dai et al., 2010; Kim et al., 2009; Saber et al., 2011).

Entretanto, a relação de biglicam e sua ação pró-migratória, com TLR-2 e TLR-4 em células placentárias não foi ainda estudada, assim como suas possíveis funções nos mecanismos de interação materno-fetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Placenta

2.1.1 Aspectos Macroscópicos da Placenta Normal

Geralmente, a placenta a termo possui um formato discóide, achatado, redondo ou oval (Torpin, 1969). É dividida em duas superfícies: a superfície fetal e a materna. A superfície fetal está anatomicamente em contato com a cavidade amniótica e possui uma aparência brilhante devido ao epitélio amniótico, que recobre a placa coriônica. A inserção do cordão umbilical se localiza na superfície fetal da placenta e, a partir dessa inserção, é possível visualizar uma intensa ramificação dos vasos sanguíneos umbilicais, penetrando na placa coriônica: os vasos coriônicos.

A superfície materna da placenta é opaca e artificial, já que é originária de um processo degenerativo na zona juncional. Esse processo leva à separação do órgão e o subdivide em placa basal, a qual continua aderida à placenta e representa a superfície materna do órgão, e no leito placentário, que permanece ao útero. A superfície materna da placenta é subdividida em uma série de cotilédones, cercados por septos. Esses cotilédones maternos são avermelhados e cada um possui duas a três vilosidades placentárias projetadas, de coloração mais clara (Benirschke et al., 2006).

2.1.2 As Vilosidades Coriônicas

O epitélio amniótico que reveste a cavidade amniótica e recobre a placa coriônica, consiste de um epitélio simples cúbico ou colunar que repousa em uma camada fina de mesoderma amniótico. A placa coriônica se posiciona entre o epitélio amniótico e a base das vilosidades coriônicas, consistindo de uma camada de mesoderma coriônico (Kaufmann, 1985).

As vilosidades coriônicas são ramificações da placa coriônica e o espaço entre as mesmas é denominado de espaço intervilosos. As vilosidades coriônicas são divididas em vilosidades-tronco, vilosidades intermediárias e vilosidades terminais. Genericamente, todas as vilosidades são formadas por mesênquima extra-embriônico, onde se encontram vasos sanguíneos fetais, células mesenquimais e células de Hofbauer. No primeiro trimestre de gestação, essa estrutura interna das

vilosidades coriônicas é revestida por uma camada de CTV e uma camada de ST. Com o desenvolvimento placentário, há uma diminuição da população de CTV, aumento do ST e potencialização das trocas gasosas e de nutrientes (Boyd, Hamilton, 1970).

A maioria das vilosidades coriônicas é flutuante e está em íntimo contato com o sangue materno presente no espaço intervilosos. Algumas vilosidades, entretanto, aderem-se à placa basal, sendo denominadas de vilosidades de ancoragem. Essas vilosidades são conectadas à placa basal através da proliferação do CTV que extravasa os limites da vilosidade, formando colunas celulares e diferenciando-se em células CTEV (Boyd, Hamilton, 1970).

2.1.3 O Trofoblasto Extraviloso

Utiliza-se o termo extraviloso a todas as células trofoblásticas que não pertencem a uma vilosidade coriônica. Dentre estas, destacam-se as células CTEV, que podem possuir dois tipos de fenótipos subdivididos em vários grupos: um fenótipo proliferativo e um fenótipo invasivo. As células CTEV com fenótipo proliferativo estão localizadas nas colunas celulares, proximalmente às vilosidades coriônicas e proliferam ativamente no primeiro trimestre da gestação (Kosanke et al., 1998). Distalmente às vilosidades coriônicas, as células-filhas derivadas das células proliferativas das colunas celulares passam a ter um fenótipo diferente, sendo denominadas de células CTEV com fenótipo invasivo (Enders, 1995; Enders, 1997a; Kemp et al., 2002). Primeiramente, essas células se desprendem da porção distal das colunas celulares e, em um estágio secundário, migram ativamente utilizando sua própria e recém-secretada MEC, denominada de fibrinoide do tipo matriz. Em um último estágio de diferenciação, alcançam um fenótipo verdadeiramente invasivo, invadindo o estroma endometrial e parte do miométrio e também vasos arteriais; essas células são subdivididas de acordo com os locais de invasão (Kaufmann, Castelucci, 1997; Kemp et al., 2002).

As CTEV que invadem os vasos sanguíneos são denominadas células CTEV endovasculares (eCTEV). Estas células invadem as artérias espiraladas, modulando sua estrutura e propriedades funcionais (Kaufmann, Castelucci, 1997; Kemp et al., 2002; Loregger et al., 2003). No entanto, se atingem a parede vascular a partir do interstício decidual ou via leito vascular são hipóteses ainda em discussão na

literatura (Loregger et al., 2003; Smith et al., 2009). As células que invadem apenas a decídua basal, mas não os vasos sanguíneos, são denominadas de células CTEV intersticiais. Este grupo de células ainda é subdividido em três subgrupos até o momento: as células CTEV pequenas e fusiformes, as células CTEV grandes e poliplóides e as células CTEV gigantes multinucleadas. As células CTEV pequenas e fusiformes são diploides, altamente invasivas e funcionalmente imunorregulatórias. Localizam-se desde a placa basal até o miométrio e são mais frequentes no início da gestação (Kemp et al., 2002). De modo similar às células tumorais, sua morfologia específica reflete um perfil altamente invasivo (Friedl, Bocker, 2000). Já as células CTEV grandes e poliplóides se localizam preferencialmente nas proximidades da placa basal e são encontradas em grande quantidade nas placentas do terceiro trimestre. Estudos conduzidos por Kemp et al. (2002) e Zybina et al., (2002, 2004) demonstram que as células CTEV grandes e poliplóides são derivadas da poliploidização de células CTEV pequenas e fusiformes, com o intuito de diminuir a capacidade invasiva das mesmas. Com relação às células CTEV gigantes multinucleadas, estas são encontradas no primeiro terço do miométrio, porém seus mecanismos de diferenciação e suas funções ainda estão sob investigação (Pijnenborg et al., 1981; Winterhager et al., 2000).

2.1.4 A Decídua Basal

Na superfície materna da placenta normal, além das células CTEV provenientes do feto, várias células provenientes da mãe estão presentes para formar a decídua basal, tais como as células deciduais e as células imunológicas.

As células deciduais representam uma população de 30 a 55% do total de células presentes na decídua basal da placenta a termo (Loke, King, 1995; Loke et al., 1995; Marzusch, Dietl, 1994) e são originadas através de um processo de diferenciação celular denominado de decidualização. A decidualização em humanos ocorre na presença de um perfil hormonal adequado. Ocorre ao final da fase secretora do ciclo menstrual, apresenta extensão variável, e se inicia ao redor das artérias espiraladas. A progressão da decidualização através de todo o estroma endometrial ocorre somente em caso de gestação ou por influência contínua de progesterona (Salamonsen et al., 2003). O processo de decidualização em mamíferos é caracterizado pela mudança do perfil gênico, morfológico e funcional

dos fibroblastos uterinos, os quais passam a assumir uma aparência epitelióide (Abrahamsohn et al., 2002; Dallenbach-Hellweg, Sievers, 1975; Iwanaga, 1983). A decidualização resulta em hiperplasia celular e no aumento no número e na complexidade de organelas citoplasmáticas (Abrahamsohn et al., 2002; Benirschke et al., 2006). Em humanos, as células deciduais apresentam junções celulares (Lawn et al., 1971) e possuem uma característica marcante: a presença de processos citoplasmáticos contendo grânulos densos no seu interior (Kisalus, Herr, 1988; Lawn et al., 1971; Stark, Kaufmann, 1973; Wynn, 1965), os quais contêm proteoglicanos de sulfato de heparana que são liberados na MEC ao seu redor (Kisalus, Herr, 1988).

Dentre as células imunológicas presentes na decídua basal, linfócitos T representam cerca de 10% da população total de células (Marzusch, Dietl, 1994; Loke, King, 1995; Loke et al., 1995). Embora na fase de implantação ocorra a produção de citocinas denominadas de Th1 ou pró-inflamatórias como o TNF- α , a IL-2 e o interferon gama (IFN- γ), no segundo trimestre prevalece a produção de moléculas reguladoras por linfócitos Th2 e Treg (interleucinas IL-4, IL-6, IL-9 e, IL-10 e TGF- β , respectivamente) (Clark, 1999; Raghupathy, 1997). No início da gestação, níveis circulantes de progesterona induzem a diferenciação de linfócitos Th0 para Th2 que produzem as citocinas IL-4, IL-6 e IL-10. A presença de um padrão predominante Th2 é vital para o sucesso gestacional, mas não substitui as funções locais também importantes das citocinas do tipo Th1 em momentos específicos e em concentrações adequadas (Doria et al., 2006).

Já os macrófagos representam de 20 a 40% do total de células na decídua basal (Marzusch, Dietl, 1994; Loke, King, 1995; Loke et al., 1995), participando ativamente de diversos processos durante toda a gestação e, dentre estes, da própria implantação embrionária (Laskarin et al., 2007; Mor, Abrahams, 2003). As células dendríticas também estão presentes na interface materno-fetal (Kämmerer et al., 2000; Oksenberg et al., 1986) e atuam tanto em mecanismos de tolerância materna ao feto quanto aos de imunidade (Aldebert et al., 2007; Munn et al., 2002). Células *Natural Killer* uterinas (NKu) também estão presentes e são imprescindíveis para o estabelecimento da implantação embrionária (Ashkar et al., 2000; Shimada et al., 2006).

2.1.5 A Matriz Extracelular Placentária

Após a decidualização, colágeno IV e lamininas (Church et al., 1996; Frank et al., 1994; Huppertz et al., 1996), outros tipos de colágenos (Aplin et al., 1989; Aplin et al., 2000; Chen et al., 2008), glicosaminoglicanos (Chen et al., 2008; Kisalus, Herr, 1988) e fibronectina (Feinberg et al., 1994; Kayisli et al., 2005) são produzidos pelas células deciduais na interface materno-fetal.

A MEC produzida pelas células CTEV é denominada de fibrinoide do tipo matriz. Essa matriz é específica das células CTEV e é diferente do fibrinoide do tipo fibrina, que se localiza aleatoriamente ao redor das estruturas fetais que fazem contato com o espaço intervilo ou organizado em camadas na placa basal (Castelucci et al., 1993; Frank et al., 2000; Kaufmann, Castelucci, 1997). Em muitos aspectos a constituição do fibrinoide do tipo matriz se assemelha à constituição da MEC presente ao redor das células deciduais. Isso ocorre devido ao fato de ambas possuírem materiais constituintes de lâmina basal, acumulados e modificados de maneira não polarizada pericelularmente, principalmente colágeno IV e lamininas (Frank et al., 1994, 2000; Huppertz et al., 1996).

2.1.6 A Invasão Trofoblástica

O painel de eventos gênicos e biológicos associados aos mecanismos de invasão das células CTEV tem sido há muito tempo comparado aos de células neoplásicas (Corvinus et al., 2003; Xu et al., 2003; Yagel et al., 1990). A relevante diferença, entretanto, é que o processo de invasão do CTEV é controlado fisiologicamente, de maneira temporal e espacial ao longo da gestação. No rol de fatores envolvidos nesta regulação estão incluídos inúmeros fatores de crescimento, morfógenos, quimiocinas, citocinas e componentes da MEC.

As células do CTEV se comunicam com as moléculas da MEC através de integrinas, sendo que as mais comuns são: $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$; diferencialmente expressas de acordo com o tipo da célula e sua localização (Aplin, 1993; Damsky et al., 1993; Kaufmann, Castelucci, 1997).

Com a diferenciação das células CTEV proliferativas em invasivas, ocorrem mudanças na expressão de moléculas de comunicação celular como E-caderinas e conexinas, importantes para o correto desenvolvimento placentário (Kaufmann,

Castelucci, 1997; Winterhager et al., 1996; Winterhager et al., 2000), nos tipos de laminina (Damsky et al., 1993; Kemp et al., 2002) e na expressão diferencial de metaloproteinases (MMPs) (Bischof et al., 1991; Huppertz et al., 1998d; Kaufmann, Castelucci, 1997).

2.2 A Matriz Extracelular

A MEC, antes interpretada como material amorfo e inerte, possui hoje um papel principal nos eventos celulares. É formada por proteínas, glicoproteínas adesivas, moléculas do sistema elástico, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, entre outros, promovendo suporte físico e bioquímico para a organização celular (Carvalho, Recco-Pimentel, 2001; Schuppan, Rhull, 1994).

2.3 Os Proteoglicanos

Os proteoglicanos são importantes constituintes da MEC e da superfície celular, onde participam da adesão celular, interações com fatores de crescimento e da remodelação da MEC (Ruoslahti, Yamaguchi, 1991; Wight, 1989). São poliânions que preenchem os espaços intercelulares e complementam o papel estrutural do colágeno, assim como participam da retenção e controle da água de solvatação (Muir, 1983). Os proteoglicanos apresentam um eixo protéico que interage covalentemente com cadeias de glicosaminoglicanos (Hascall, Kimura, 1982; Iozzo, Murdoch, 1996), formando a estrutura padrão dos proteoglicanos. A única exceção à regra é o ácido hialurônico, que não é sulfatado e nem interage com o eixo protéico para formar o proteoglicano (Iozzo, 1985).

Dentre as várias famílias de proteoglicanos existentes, a família dos SLRPs possui diversas funções regulatórias de fenômenos celulares, como proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração e invasão (Fisher, 1999; Kinsella et al., 1997; Moscatello et al., 1998; Schaefer, Iozzo, 2008; Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2003).

2.4 Os Pequenos Proteoglicanos Ricos em Leucina

São produtos de diferentes genes, possuem alto grau de sofisticação estrutural e apresentam funções bivalentes. São altamente conservados evolucionariamente, possuindo muitos domínios ricos em cisteína na região N-terminal e sequências repetidas de leucina em sua organização genômica, comuns a diversas espécies (Scott, 1993). Podem ser sintetizados como glicoproteínas, contendo oligossacarídeos do tipo N-ligados, ou como proteoglicanos, contendo condroitim/dermatam/queratam sulfatos ligados ao eixo proteico (Hocking et al., 1998; Iozzo et al., 1999).

Os SLRPs são muito conhecidos pela sua capacidade de ligação a sítios específicos nas superfícies de vários tipos de colágeno, exercendo forte influência na agregação e organização das fibrilas (Ruggeri, 1984; Iozzo et al., 1999; Sanches et al., 2010).

A família dos SLRPs é dividida em cinco classes, as quais possuem dezessete componentes (Tabela 1).

Tabela 1- Componentes da família dos SLRP.

SLRP	
<u>Classe I</u>	Asporim
	Decorim
	Biglicam
	MEC2
<u>Classe II</u>	Fibromodulina
	Lumicam
	Keratocam
	Proteína rica em repetições de prolina/arginina e leucina (PRELP)
	Osteoadarina/Osteomodulina
<u>Classe III</u>	Epificam
	Mimicam/Osteoglicina
	Opticina/Oculoglicina
<u>Classe IV</u>	Chondroaderina
	Tsukushi
	Nictalopina
<u>Classe V</u>	Podocam
	Proteína similar ao podocam

Adaptado de Schaefer, Iozzo, 2008.

2.5 O Biglicam

Fisher e colaboradores (1983) mostraram pela primeira vez dois proteoglicanos em ossos de bezerro: um ligado a uma cadeia de sulfato de condroitim e outro ligado a duas cadeias. Em seguida, proteoglicanos similares foram encontrados na cartilagem bovina, sendo denominados de proteoglicano I e II (PG-I e PG-II) de acordo com suas diferenças de tamanho (Rosenberg et al., 1985). Esses dois proteoglicanos aparentemente similares possuíam diferentes composições de aminoácidos (Fisher, Termine, 1985) com uma homologia de 55 %, sendo que PG-I foi designado como uma derivação de duplicação gênica de PG-II

(Fisher et al., 1989). O nome biglicam só foi sugerido por Fisher e colaboradores (1989), para substituir a designação de PG-I e devido à presença das duas cadeias de glicosaminoglicanos.

O biglicam é amplamente conhecido como sendo um proteoglicano de 300 kDa com um *core* protéico de 38 kDa (Fisher et al., 1999). Entretanto, diversas publicações apresentam o proteoglicano com diferentes isoformas: i) uma molécula grande de biglicam e identificada em maiores concentrações em ossos com o envelhecimento (Roughley et al., 1993); ii) duas moléculas de biglicam de 37 e 41 kDa respectivamente, ambas presentes em maiores concentrações na cartilagem durante o envelhecimento (Johnstone et al., 1993); iii) uma molécula de biglicam altamente similar ao fator de crescimento estimulador de colônias (CSF), com 100 kDa e alta atividade hematopoiética (Kamo et al., 1993; Kikuchi et al., 1995; Kikuchi et al., 2000) e; iv) três moléculas de 45 kDa, 110 kDa e 220 kDa, secretadas por fibroblastos pulmonares (Tufvesson et al., 2002). Além do grande número de prováveis isoformas, o biglicam pode se ligar a outras moléculas de biglicam, formando estruturas diméricas ou hexaméricas, possuindo a tendência de se auto-associarem em um ambiente com prevalência de cátions (Liu et al., 1994a; Liu et al., 1994b). Isoformas solúveis de biglicam também já foram reportadas, sendo em monômeros de 100 kDa ou oligomêros de 201 kDa (Tomoyasu et al., 1998).

2.5.1 Proliferação, Morte e Sobrevivência

O biglicam é conhecido por ser um fator promotor de sobrevivência em neurônios (Kappler et al., 1997) e em células mesangiais (Schaefer et al., 2003). Também é conhecido por promover proliferação em linfócitos pré-B (Oritani, Kincade, 1996), em células-tronco da medula óssea (Tomoyasu et al., 1998), em precursores da linhagem monocítica no timo (Kamo et al., 1993; Kikuchi et al., 2000), em células endoteliais de artérias coronárias (Shimizu-Hirota et al., 2004) e em osteoclastos (Douglas et al., 2008). Entretanto, alguns estudos mostraram o oposto, apresentando o biglicam como promotor de morte celular por apoptose em pré-adipócitos (Ward, Ajuwon, 2011) e com atividade na redução da proliferação de precursores osteogênicos (Inkson et al., 2009).

2.5.2 Diferenciação

O biglicam também possui importante atividade na diferenciação de vários tipos celulares. Aumenta a diferenciação de células-tronco em monócitos na medula óssea (Tomoyasu et al., 1998) e no timo (Kamo et al., 1993; Kikuchi et al., 2000); nos ossos, induz diferenciação osteoblástica (Bi et al., 2006; Inkson et al., 2009; Mochida et al., 2006) e osteoclástica (Bi et al., 2006); e no tecido adiposo, participa da diferenciação de células-tronco em adipócitos (Knippenberg et al., 2006).

2.5.3 Inflamação

Nos últimos anos, o papel imunológico do biglicam tem sido muito estudado, principalmente após sua inclusão no grupo das DAMPs e como uma molécula pertencente à imunidade inata. Entretanto, seu exato papel ainda é muito controverso. Enquanto muitos estudos apontam o biglicam como uma molécula altamente pró-inflamatória (Kiss et al., 2010; Moreth et al., 2010; Schaefer et al., 2005; Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2000; Wu et al., 2007), outros mostram que o biglicam é anti-inflamatório e tolerogênico (Baroni et al., 2003; Chieppa et al., 2003; Kikushi et al., 2008).

2.5.4 Migração

Amplamente reportado como potente fator pró-migratório, o biglicam promove migração de células endoteliais (Kinsella et al., 1997; Shimizu-Hirota et al., 2004), de fibroblastos (Hayashi et al., 2005; Larsen et al., 2004; Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2003), de células de carcinoma pancreático e de osteossarcoma (Groth et al., 2005). Durante a migração das células endoteliais, o biglicam foi encontrado nos lamelipódios, no local de formação e dissolução das placas de adesão (Kinsella et al., 1997). Outrossim, a administração exógena de biglicam foi capaz de promover a formação de lamelipódios (Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2003) através do substrato 1 da toxina botulínica C3 relacionada a Ras (Rac1) e da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase-oxidase (NADPH oxidase) (Groth et al., 2005).

2.5.5 Sinalização Intracelular

Como descrito anteriormente, embora existam vários estudos mostrando diferentes papéis desempenhados pelo biglicam nas células, pouco se sabe sobre seus receptores e vias de sinalização. O biglicam parece interagir com clatrin, sendo endocitado via *core* protéico e internalizado (Götte et al., 2004; Hausser et al., 1992). Entretanto, não se sabe se o biglicam endocitado é capaz de ativar vias de sinalização. Além do processo endocítico, o biglicam pode se ligar a vários receptores na membrana citoplasmática das células. As suas cadeias de sulfato de condroitim são capazes de se ligar ao receptor α -dístroglicam na membrana de fibras musculares, exercendo papel importante na formação do complexo distrófico (Bowe et al., 2000). O *core* protéico do biglicam pode ainda se ligar a receptores ligados à imunidade inata, como o SR-A (Santiago-Garcia et al., 2003), o MR (Chieppa et al., 2003), os P2X4 e P2X7 (Babelova et al., 2009) e os TLR-2 e TLR-4 (Babelova et al., 2009; Derbaly et al., 2010; Schaefer et al., 2005; Popovic et al., 2011). Além desses receptores, o biglicam também pode se ligar ao EGF-R (Iacob, Cs-Szabo, 2010) e à proteína 6 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP-6) (este, somente em conjunto com Wnt) (Berendsen et al., 2011).

Todavia, não são conhecidas as vias de sinalização ativadas pela ligação do biglicam ao SR-A em macrófagos e ao MR em células dendríticas, mas o efeito final da ligação ao MR é a produção de citocinas anti-inflamatórias e tolerogênicas, além da ativação e maturação de células dendríticas para um perfil tolerogênico (Chieppa et al., 2003). A ligação de biglicam aos receptores P2X4 e P2X7 ativa a via dos inflamassomas envolvendo a família do receptor similar ao NOD contendo um domínio *pyrin* 3 (NLRP3) e a proteína puntiforme associada à apoptose contendo um domínio CARD (ASC), levando à ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β (Babelova et al., 2009). Em condrócitos, quando o biglicam se liga ao EGF-R, tanto a via da quinase reguladora de sinais extracelulares (ERK) quanto a via da AKT são ativadas, sendo que AKT é capaz de bloquear ERK quando sua ativação é prolongada, podendo ser um mecanismo de homeostase em casos de excesso de EGF livre (Iacob, Cs-Szabo, 2010). Já a ligação ao LRP6 pelo biglicam só ocorre em presença de Wnt3a, levando a uma ativação mais intensa da via canônica do Wnt, com participação do fator de transcrição relacionado ao caule da couve 2 (Runx2) e do fator de transcrição 4 (TCF-4) (Berendsen et al., 2011). Outros estudos ainda, mostraram outras vias de sinalização, mas não indicaram que receptores estariam participando da ligação com o biglicam. No trabalho de Groth e colaboradores

(2005), por exemplo, foi mostrada a adesão e migração aumentadas na presença de biglicam exógeno, mecanismos estes dependentes de Rac1 e NADPH oxidase. Já em células ósseas, o biglicam é capaz de ativar vias distintas produzindo efeitos antagônicos, sendo que pode ativar ERK e Runx2 levando a mineralização óssea, ou ainda pode ativar a via das Smads, promovendo aumento na diferenciação de osteoblastos (Wang et al., 2010; Wang et al., 2011). Além disso, o estudo realizado por Schaefer e colaboradores (2005) mostrou que o biglicam pode se ligar aos TLR-2 e TLR-4 em macrófagos murinos, promovendo inflamação estéril. Essa ligação recruta o gene 88 de resposta primária de diferenciação mielóide (MyD88) e ativa a via clássica dos TLRs, envolvendo ativação de p38 e ERK, com translocação do fator nuclear kappa B (NFkB) para o núcleo e produção de citocinas pró-inflamatórias.

2.6 Receptores do tipo *Toll-like* 2 e 4

Os TLRs são receptores imunológicos, capazes de se ligar a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de microorganismos como bactérias, fungos, protozoários e vírus (Beutler, 2004; Janeway, Medzhitov, 2002). Os TLRs fazem parte do grupo de sensores da imunidade inata denominados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e são expressos na membrana citoplasmática, lisossomos e endossomos (Takeda, Akira, 2005).

Até o presente momento, 11 TLRs foram identificadas em mamíferos (Takeda, Akira, 2001). Cada receptor difere em sua especificidade: os TLRs da superfície celular reconhecem diversos padrões microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas (TLR-4), ácidos lipoteicóicos de bactérias gram-positivas e lipoproteínas bacterianas (TLR-1/TLR-2 e TLR-2/TLR-6), e flagelina (TLR-5), enquanto os TLRs endossomais detectam principalmente ácidos nucleicos microbianos, como ácidos ribonucleicos (RNA) de dupla fita (TLR-3), RNA de fita simples (TLR-7) e ácidos desoxirribonucleicos (DNA) (TLR-9) (Iwasaki et al., 2010; Iwasaki, Medzhitov, 2004).

Além da identificação de PAMPs, os TLRs também estão envolvidos com o reconhecimento de sinais endógenos ligados a dano tecidual e perigo. Fragmentos de cromatina e de complexos ribonucleicos podem ativar TLR-7 e TLR-9 levando ao desenvolvimento de doenças autoimunes sistêmicas (Marshak-Rothstein, Rifkin,

2007), entretanto, esta ativação é acidental, visto que os fragmentos de ácidos nucleicos próprios são confundidos com patógenos pelos TLRs (Iwasaki et al., 2010).

Outras moléculas endógenas também podem ser identificadas pelos TLRs, especialmente TLR-2 e TLR-4, porém de importância fisiológica, como fragmentos de ácido hialurônico (Jiang et al., 2005), fragmentos de sulfato de heparan (Johnson et al., 2002), biglicam (Schaefer et al., 2005), versicam (Kim et al., 2009), proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB-1) (van Beijnum et al., 2008), espécies reativas de oxigênio (ROS) (Frantz et al., 2001), proteína surfactante A (Guillot et al., 2002), fibrinogênio (Smiley et al., 2001), fragmentos de fibronectina (Okamura et al., 2001), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) (Oppenheim, Yang, 2005) e proteínas de choque térmico (HSPs) (Chen et al., 2007). No entanto, os ligantes endógenos que ativam TLR-2 e TLR-4 não são capazes de ativar uma resposta adaptativa como os PAMPs, sendo ligados especialmente à ativação de genes ligados ao reparo tecidual e homeostase (Iwasaki et al., 2010).

Embora o reconhecimento de diferentes padrões moleculares sejam específicos entre o TLR-2 e o TLR-4, ambos dividem uma via de sinalização comum (Beutler, 2004), que envolve a proteína adaptadora MyD88 (Takeda, Akira, 2005), rápida fosforilação de ERK (Reimann et al., 1994) e p38 (Baldassare et al., 1999) e translocação de NFkB (Cohen, 2002), levando à expressão de genes pró-inflamatórios (O'Neil, 2002).

2.7 TLRs na Interface Materno-Fetal

A interface materno-fetal é um local imunologicamente único, pois ao mesmo tempo em que é responsável pela tolerância materna ao feto alogeneico, defende mãe e feto de possíveis patógenos. A imunidade inata é a primeira linha de defesa imunológica, providenciando rápida resposta contra patógenos através de sua habilidade intrínseca de distinguir moléculas próprias e não-próprias (Janeway, Medzhitov, 2002). Por essas razões, a imunidade inata possui grande importância no microambiente materno-fetal durante a gestação.

Todos os TLRs e suas proteínas acessórias já foram descritas na placenta humana, inclusive em células trofoblásticas (Klaffenbach et al., 2005; Mitsunari et al., 2006). TLRs 2, 3, 4, 5, 6 e 9 foram localizados nas células CTV e no ST (Mitsunari et

al., 2006). Além disso, todos os TLRs, assim como as proteínas acessórias, *cluster* de diferenciação (CD) 14, MyD88, antígeno linfocitário 96 (MD-2), fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), proteína relacionada ao TRAP (TIRP) e proteína adaptadora contendo domínio TIR e indutora de interferon- β (TRIF) foram identificados em células de linhagem de coriocarcinoma JAR e BeWo (Klauffenbach et al., 2005). Entretanto, as expressões de alguns TLRs podem ser diferentes durante toda a gravidez, como no caso do TLR-6 e do TLR-4. O TLR-6 não é expresso em trofoblasto de primeiro trimestre, mas sim no terceiro trimestre (Mitsunari et al., 2006; Abrahams et al., 2004); o TLR-4 possui expressão aumentada no terceiro trimestre em relação ao primeiro trimestre (Beijar et al., 2006). A localização dos receptores também difere em alguns estudos. Por exemplo, TLR-2 e TLR-4 foram identificados em CTV, ST e CTEV de placentas de primeiro trimestre (Holmlund et al., 2002), enquanto que outro estudo mostrou que os mesmos não são expressos em ST (Klauffenbach et al., 2005).

Tanto o TLR-2 quanto o TLR-4 são bem descritos na interface materno-fetal. Holmlund e colaboradores (2002) mostraram que o estímulo com zimossam e LPS em células trofoblásticas induz a produção de IL-6 e IL-8. Já outro estudo mostrou que a ligação de LPS ao TLR-4 produz uma resposta inflamatória leve, com modesta regulação de citocinas pró-inflamatórias em células trofoblásticas de primeiro trimestre, enquanto a ligação de peptidoglicano ao TLR-2 induz apoptose nestas células (Abrahams et al., 2004). No entanto, enquanto o LPS não induz apoptose em trofoblasto, o HSP-60, através de TLR-4 induz (Equils et al., 2006). Já o efeito de apoptose derivado da ligação de TLR-2 ao peptidoglicano não se repete quando um lipopeptídeo de micoplasma se liga ao TLR-2, promovendo uma resposta pró-inflamatória (Mitsunari et al., 2006). Esses fatos corroboram com a premissa de que diferentes ligantes podem induzir respostas distintas.

3 OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi investigar o papel do biglicam nos processos de migração e invasão de células trofoblásticas humanas.

Especificamente, utilizando placentas de primeiro e terceiro trimestres de gestação, cultura primária de células CTEV e linhagem de células trofoblásticas, procurou-se analisar:

- 1) a expressão protéica de biglicam, TLR-2 e TLR-4;
- 2) se *in vitro* o biglicam é capaz de modular a proliferação, migração e invasão de células CTEV isoladas e de linhagem de células trofoblásticas;
- 3) se os efeitos biológicos induzidos pelo biglicam *in vitro* são dependentes de TLR-2/4;
- 4) a via de sinalização intracelular utilizada após a interação biglicam-TLR-2/TLR-4 em células CTEV isoladas e em linhagem de células trofoblásticas;
- 5) se o biglicam está associado com a expressão de citocinas pró-inflamatórias nas culturas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das Placentas de Primeiro Trimestre de Gestação

As placentas de primeiro trimestre de gestação ($n = 60$) foram coletadas em Viena, Áustria, na Clínica Gynmed. Essas placentas foram derivadas de abortos de gestações sem complicações entre a sexta e a décima segunda semana, com consentimento legal e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O uso destas placentas foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Médica de Viena em processo único pré-existente na Unidade de Biologia da Reprodução e respeitou os princípios éticos, práticos e de biossegurança das leis internacionais.

4.2 Obtenção das Placentas a Termo

As placentas a termo utilizadas foram obtidas de gestações saudáveis coletadas em São Paulo, no Serviço de Obstetrícia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Trinta placentas derivadas de cirurgias cesáreas eletivas de gestações saudáveis entre a trigésima sexta e a quadragésima semana, foram utilizadas neste trabalho.

A coleta das amostras respeitou os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e condizentes com as exigências impostas pela Comissão de Ética envolvendo Pesquisas em Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas e do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. As considerações éticas foram baseadas no uso do material para fins científicos, com sigilo da identidade das pacientes e sem que constrangimento das instituições ou pessoas envolvidas. As coletas foram realizadas através de cirurgias cesarianas, as quais respeitaram os protocolos técnicos do Hospital e dos médicos envolvidos. As pacientes foram previamente informadas e o material somente foi utilizado sob o expreso consentimento destas em formulário próprio de acordo com o Ministério da Saúde. O protocolo para o uso experimental das placentas a termo foi aprovado pela Comissão de Ética envolvendo Pesquisas em Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Registro CEP-HU/USP: 1043/10 – SISNEP CAAE: 0042.0.198.019-10).

Como critérios de inclusão, foram exigidos: acompanhamento pré-natal e protocolo terapêutico no Serviço Obstétrico; cirurgia cesariana neste Serviço

Obstétrico; ausência de enfermidades de caráter autoimune, infeccioso ou genético; e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, conforme recomendações dos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas e do Hospital Universitário – USP.

4.3 Separação de células CTEV de Primeiro Trimestre de Gestação

As células CTEV foram obtidas a partir de vilosidades coriônicas de placentas de primeiro trimestre ($n = pool$ de 6 a 8 por preparação), isoladas por dispersão enzimática (Tarrade et al., 2001) e separação por gradientes de densidade de Percoll (10-70%, com intervalos de 10%; Pharmacia, Uppsala, Suécia) (Pollheimer et al., 2011).

O material foi lavado repetidamente em tampão fosfato salina (PBS) gelado e estocado em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes F-12 (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 0,05 mg/mL de gentamicina e 2,5 µg/mL de fungizone (ambos da Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) por uma noite a 4 °C. Logo após, as pontas das vilosidades coriônicas foram dissecadas e o material separado em tubos contendo 10 g de tecido, lavado com solução balanceada de Hank (HBSS) gelada (Sigma-Aldrich) e, em seguida, em duas lavagens com HBSS pré-aquecida e outra em HBSS gelada. Após as lavagens, o meio de digestão contendo 20 mL de HBSS, 1 mL de tripsina a 2,5% (Life Technologies) e 250 µL de DNase I (Sigma-Aldrich) foi adicionado e a digestão ocorreu por 30 min a 37 °C. Após a inativação da atividade enzimática, o material foi filtrado por um *cell strainer* de 70 µm e lavado novamente com HBSS gelado. Logo após, foram repetidas as etapas de digestão, inativação enzimática, filtragem e lavagem, para então centrifugar a 1200 rpm por 10 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em HBSS, novamente filtrado e adicionado nos gradientes de densidade de Percoll. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2350 rpm por 24 min a 4 °C e as camadas entre 30 e 50% foram coletadas. Meio DMEM/F12 suplementado e contendo 10% de soro fetal bovino (FBS gold; Life Technologies) foi acrescido às células e nova centrifugação a 1200 rpm por 10 min a 4 °C foi realizada. A seguir, as células foram diluídas em tampão CASY e contadas

através da tecnologia CASY de contagem celular em multicampos elétricos (Innovatis, Reutlinger, Alemanha).

4.4 Separação de Células CTEV de Placentas a Termo

O isolamento das células CTEV a partir da decídua basal das placentas a termo foi idealizado e adaptado tendo como base a preparação de culturas primárias de células CT do amniocório (Shorter et al., 1990).

Para esse procedimento, a decídua basal com cerca de 5 mm de espessura foi cuidadosamente dissecada das vilosidades coriônicas e da membrana amniocoriônica. Os fragmentos da placa basal foram então lavados exaustivamente em PBS e HBSS e triturados a seco. Em seguida, para cada 5 g de tecido triturado, foram acrescentados 20 mL de meio DMEM/F12 suplementado com 1% de penicilina/streptavidina, 0,5% de gentamicina, 0,25% de anfotericina B e 4% de albumina sérica bovina (BSA) (todos da Life Technologies), 1 mg/mL de collagenase II e 25 U/mL de DNase I (ambas da Sigma-Aldrich) para digestão por 1 h a 37 °C em banho-Maria, sob agitação. Logo após, a atividade enzimática foi inativada e o material duplamente filtrado em *cell strainer* de 100 µm e 70 µm, sequencialmente. O material foi então centrifugado a 400 g por 10 min a 25 °C e ressuspenso em meio DMEM/F12 suplementado com os antibióticos descritos anteriormente, 10% de FBS, 0,01% de insulina, 520 µg/mL de lactato de cálcio, 56 µg/mL de piruvato de sódio, 0,24 mg/mL de timidina, 0,80 mg/mL de adenosina, 0,85 mg/mL de guanosina, 0,73 mg/mL de uridina e 1% de BSA (todos da Life Technologies), formando o que denominamos de DMEM/F12 completo.

As células foram então isoladas por gradientes de densidade de Percoll (30 e 60%; GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) durante centrifugação a 700 g por 30 min a 25 °C (Stenqvist et al., 2008). As células presentes na camada de 30% foram coletadas e, quando necessário, hemácias remanescentes foram lisadas utilizando centrifugação a 400 g por 5 min a 25 °C em solução de cloreto de amônio a 0,83% em água destilada. Após lavagens em PBS, as células foram contadas em hemocítômetro.

4.5 Cultura das CTEV de Primeiro Trimestre e de Placentas a Termo

As células CTEV isoladas de primeiro trimestre foram mantidas em meio DMEM/F12 suplementado com antibióticos e 10% de SBF ou DMEM/F12 puro, enquanto as células CTEV de termo foram mantidas em meio DMEM/F12 completo ou meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Life Technologies) com antibióticos, dependendo dos experimentos realizados. Ambas as células foram plaqueadas em diferentes concentrações, dependendo das técnicas empregadas, em substratos de fibronectina (1:1 em PBS) ou Matrigel (1:1 em DMEM/F12; ambas da BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e mantidas por até 48 h em estufa úmida contendo 5% de CO₂.

4.6 Caracterização das CTEV de Placentas a Termo

Visto que as células CTEV provenientes da placa basal de placentas a termo estavam sendo isoladas pela primeira vez e não possuíam descrição na literatura, foram necessários alguns experimentos para caracterizá-las.

4.6.1 Imunofluorescência

Células CTEV isoladas da decidua basal foram plaqueadas (3×10^5 células/poço) e, após 48 h, fixadas em álcool metílico a - 20 °C por 10 min. Em seguida, as células foram incubadas com BSA a 1% em PBS por 1 h e os anticorpos primários anti-citoqueratina-7 (CK-7; 1:100; Dako; Glostrup, Dinamarca), anti-antígeno leucocitário humano G1 (HLA-G1; 1:100; Exbio, Praga, República Checa), anti-vimentina (Vm; 1:50; Dako), anti-fosfatase alcalina placentária (PIAP; *Ready-to-use*; Life Technologies), anti-fator de crescimento placentário (PIGF; 1:100; Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-CD68 (1:100; Dako), anti-integrina $\alpha 1$ (1:100; Millipore, Billerica, MA, EUA) ou anti-integrina $\alpha 5$ (1:50; Abcam) foram diluídos em PBS/BSA a 2 % e incubados por uma noite a 4 °C. Após lavagens, os anticorpos secundários anti-camundongo-fluoresceína isotiocianeto (FITC) (1:20; Dako), anti-coelho-tetrametilrodamina-5-6-isotiocianeto (TRITC) (1:50; Sigma-Aldrich), anti-camundongo Alexa 488 (1:1000; Molecular Probes; Eugene, OR, EUA) ou anti-

coelho Alexa 568 (1:1000; Molecular Probes) foram incubados em PBS por 1 h em temperatura ambiente. Os núcleos foram marcados com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 1:1000 em PBS; Sigma-Aldrich) e as células montadas com PBS/glicerol (1:9; v/v) em lamínulas.

4.6.2 Citometria de Fluxo

A viabilidade das células plaqueadas (3×10^5 células/poço) foi determinada após incubação com o iodeto de propídeo (PI, 2 $\mu\text{g/mL}$) e análise em citômetro de fluxo FACSCanto® (BD Biosciences) em culturas de 24 e 48 h. Para análise de CK-7, as células plaqueadas (3×10^5 células/poço) e cultivadas por 48 h foram removidas do substrato com uma solução de tripsina a 0,5%; em seguida, a ação enzimática foi neutralizada com soro normal de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) a 5% em PBS por 1 h. Após lavagens em PBS, as células foram incubadas com o kit para fixação e permeabilização (e-Bioscience, San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fornecedor. Na sequência, as células foram incubadas com o imunocomplexo (composto pelo anticorpo primário anti-CK-7 e anticorpo secundário anti-camundongo Zenon® Alexa 488 (1:2,5; v/v), kit de marcação Zenon Tricolor®, Life Technologies) de acordo com o fabricante, por 1 h, a temperatura ambiente. Logo após essa incubação, as células foram ressuspensas em PBS/BSA a 0,1% e analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto®.

4.6.3 Teste de Exclusão por Azul de Trypan

A viabilidade celular e o número de células em cultivo foi determinado pelo teste de exclusão do azul de trypan em um hemocitômetro. As células plaqueadas (2×10^4) foram analisadas imediatamente após seu isolamento e após 24 e 48 h de cultura. A análise foi realizada utilizando-se 0,4% de Azul de Trypan na razão 1:1 (v/v) em meio de cultura. Foram contados o número de células viáveis e de células não viáveis.

4.6.4 Extração de RNA e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

RNA total foi extraído das células plaqueadas (3×10^5 células/poço) utilizando Trizol® (Life Technologies), conforme especificações do fabricante. O RNA foi analisado por espectrofotometria ultravioleta por meio de um espectrofotômetro ND-100 (Nano Drop Technologies, Rockland, DE, EUA) e o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando kit *Superscript® First Strand* (Life Technologies). O ensaio de RT-PCR foi realizado usando Taq Polimerase (Life technologies) e os *primers* utilizados foram: *18S* (*Forward* 5' GTAACCCGTTGAACCCATT 3' e *Reverse* 5' CCATCCAATCGGTAGCG 3'), *GADPH* (*Forward* 5' CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT 3' e *Reverse* 5' ACCCACTCCTCCACCTTTGA 3'), *MMP-2* (*Forward* 5' AGCTCCCGGAAAAGATTGATG 3' e *Reverse* 5' CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT 3') e *MMP-9* (*Forward* 5' GAGGTGGACCGGATGTTCC 3' e *Reverse* 5' AACTCACGCGCCAGTAGAAG 3'). As respectivas temperaturas de anelamento e tamanhos dos produtos de PCR foram de 56 °C e 155 pb, 60 °C e 102 pb, 60 °C e 101 pb, e 54 °C e 106 pb. Os produtos de PCR foram visualizados com brometo de etídio após eletroforese em géis de agarose a 1%.

4.6.5 Ensaios de Invasão

Os ensaios de invasão foram conduzidos em câmaras bipartites do tipo *Transwell* (BD Biosciences) com poros de 8 µm. Os insertos foram revestidos com 15 µL de Matrigel (1:1, v/v em DMEM/F12; BD Biosciences) ou 30 µL de fibronectina (1:1, v/v em PBS). Após polimerização, as células foram plaqueadas ($5,6 \times 10^4$ células/poço), tratadas com 10 ng/mL de TGF-β (R&D Systems) ou 50 ng/mL de EGF (Life Technologies) e cultivadas por 48 h. Após esse período, as células presentes na face superior do inserto foram gentilmente retiradas com o uso de um cotonete e a face inferior foi fixada com paraformaldeído a 4% em PBS, por 20 min. Logo após, as células foram coradas com uma solução de cristal violeta a 0,2% em álcool metílico por 45 min e lavadas exaustivamente em PBS. Células ou prolongamentos citoplasmáticos visualizados na face inferior dos insertos foram então contados em 7 campos ($\times 200$). A porcentagem de invasão foi calculada

através da comparação da quantidade de células nas membranas controles e nas tratadas.

4.6.6 Zimografia em Gelatina

A presença e atividade enzimática de MMPs nos sobrenadantes das culturas de células CTEV foram demonstradas por zimografia em gelatina. Os sobrenadantes foram coletados após o isolamento e 24 e 48 h de cultura, a quantidade protéica foi padronizada com base nos lisados celulares. Assim, 30 μ g de proteína foi separada em gel SDS-PAGE a 10% contendo 5 mg/mL de gelatina. Os géis foram lavados em Triton X-100 a 2,5% em água destilada e incubados a 37 °C em tampão de reação (Tris-ácido clorídrico (HCl) a 0,05 M e pH 8,5, cloreto de cálcio (CaCl_2) a 10mM e cloreto de zinco (ZnCl_2) a 1 μ M). Os géis foram corados com a solução de azul de Coomassie (Azul brilhante de Coomassie R-250 a 0,5% em álcool metílico a 10% e ácido acético a 10%) e descorados em solução de álcool metílico a 10% e ácido acético a 10%. As zonas claras resultantes da lise da gelatina contrastadas com o fundo azul do corante indicaram a presença de atividade de proteinases.

4.6.7 Documentação Fotográfica e Análise Digital

O microscópio óptico invertido Axiovert S100 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) foi utilizado para análise de morfologia geral e contagem celular. As reações de imunofluorescência foram analisadas utilizando microscópio de fluorescência Axioscop 2 (Zeiss) e as imagens capturadas pelo programa AxioVision (Zeiss). Os dados resultantes da citometria de fluxo foram analisados através do programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

4.6.8 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada através de testes comparativos múltiplos *Student-Newman-Keuls* utilizando o programa *Prism®* (GraphPad; San Diego, CA, EUA). A distribuição de Gauss e a igualdade das variâncias foram examinadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Valores estatisticamente significantes foram considerados quando $p < 0,05$.

4.7 Cultura da linhagem celular SGHPL-5

As células SGHPL-5 foram gentilmente doadas por Guy S. Whitley, da Universidade *St. George* em Londres. Essas células foram cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de FBS, antibióticos e 2 mM de glutamina (Life Technologies). Todos os experimentos foram realizados utilizando essas células entre a oitava e a décima quinta passagem, sendo que cada passagem era realizada após as células alcançarem 80% de confluência nas placas de cultura.

4.8 Construção de um *knockdown* estável de AKT1

O *knockdown* estável de AKT1 em SGHPL-5 foi gerado através da transdução de um vetor LMP retroviral (Open Biosystems, Huntsville, AL, EUA) adaptado a um *short-hairpin* microRNA (shRNAmir), como descrito anteriormente (Bilban et al., 2009). Em resumo, o shRNAmir obtido de um vetor pSM2 (Open Biosystems) e direcionado contra AKT1 humana foi subclonado com enzimas de restrição XhoI e EcoRI (Life Technologies) no vetor LMP. Para produzir as partículas virais desejadas, células da linhagem HEK293FT (Life Technologies) foram co-transfectadas transientemente com um vetor contendo proteínas do envelope viral (gag, pol e env), um vetor contendo VSV-G e plasmídeos contendo tanto shRNAmir controle, quanto shRNAmir-AKT1. Para a transfecção das células HEK293FT, foi utilizada a Lipofectamina 2000 (Life Technologies) e, após 48 h, as partículas virais presentes no sobrenadante das células foram coletadas, suplementadas com 8 µg/mL de *Polybrene* (Sigma-Aldrich) e usadas para transfectar as células SGHPL-5. As células estáveis foram selecionadas pela adição de puromicina (5 ng/mL; Sigma-Aldrich) por um período médio de duas semanas. A eficácia do *knockdown* foi confirmada por análise de Western Blot e de acordo com publicações prévias (Bilban et al., 2009; Pollheimer et al., 2011).

4.9 Processamento das Placentas para Técnicas Histológicas

As vilosidades coriônicas e a decídua basal de primeiro trimestre, assim como as placentas a termo, foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS por 24 h. As

amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas com xilol e incluídas em Histosec (Merck, Darmstadt, Alemanha). Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram realizados através de um micrótomo Microm HM200 Ergostar (Microm, Hergestellt in Walldorf, Alemanha) e depositados sobre lâminas histológicas revestidas previamente com 3-aminopropil-trietoxissilano (Sigma-Aldrich).

4.10 Imunofluorescência e Imuno-Histoquímica das Placentas

As placentas de primeiro trimestre de gestação foram divididas em vilosidades coriônicas (VC) e decídua basal (DB). Após a desparafinização com xilol, a hidratação em concentrações decrescentes de etanol e lavagem em água destilada, o material sofreu resgate antigênico com tampão citrato de sódio (1x, Dako) por 10 min a 850 W em microondas, seguido de resfriamento no próprio tampão por 30 min em temperatura ambiente. Subsequentemente, os cortes foram incubados em gelatina de pele de peixe a 0,05% (Sigma-Aldrich) em PBS por 1 h e, logo após, em PBS contendo 1% de glicina por 1 h para bloqueio dos sítios antigenicos. Após, anticorpos primários anti-biglicam (1:30; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), anti-TLR-2 (1:67; R&D Systems) e anti-TLR-4 (1:67; R&D Systems) foram incubados em conjunto com anticorpos primários anti-citoqueratina-7 (CK-7; 1:100; Dako) e anti-vimentina (Vm; 1:50; GeneTex, Irvine, CA, EUA) - diluídos em pele de peixe a 0,05% em PBS - por uma noite a 4 °C. Após lavagens com PBS, os anticorpos secundários anti-cabra AlexaFluor 488, anti-camundongo AlexaFluor 586 e anti-coelho AlexaFluor 488 (1:1000; Molecular Probes) foram diluídos em pele de peixe a 0,05% em PBS e incubados por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas lavagens com PBS, os núcleos foram marcados com DAPI (1:1000 em PBS; Sigma-Aldrich) e os cortes montados com *Fluoromount G* (Southern Biotechnology, Birmingham, Reino Unido) em lamínula. Como controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos das reações.

Os cortes de placentas a termo foram desparafinizados e hidratados como descrito anteriormente, porém uma etapa para bloqueio da peroxidase endógena contendo 3% de peróxido de hidrogênio em álcool metílico por 10 min foi realizada entre as lavagens em etanol absoluto e etanol 95%. Após a hidratação, procederam-se os bloqueios com solução de bloqueio comercial (SuperBlock Blocking Buffer, Pierce, Rockford, IL, EUA) por 1 h e, logo após, com solução de bloqueio comercial

e TBS/BSA a 2% (1:1, v/v) acrescido de 5% de soro normal de cabra (Vector Laboratories) por 1 h. Em seguida, os anticorpos anti-biglicam, anti-TLR-2 e anti-TLR-4 foram diluídos em TBS/BSA a 1% com 10% de solução de bloqueio por uma noite a 4 °C. Após lavagens em PBS, o anticorpo secundário anti-cabra conjugado com peroxidase (1:500; KPL, Gaithersburg, MD, EUA) e diluído em TBS/BSA a 1% com 10% de solução de bloqueio, foi incubado nos cortes por 1 h, a temperatura ambiente. Depois de novas lavagens em PBS, o produto da reação imuno-histoquímica foi revelado pela ação do tetrahydroclorato de 3',3-diaminobenzidina (*Fast DAB*; Sigma-Aldrich) por 10 min. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer, diferenciados em água corrente por 10 min, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados sob lamínula em resina de Dammar. Como controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos das reações.

4.11 Imunofluorescência das Células CTEV e SGHPL-5

Células CTEV derivadas de placentas de primeiro trimestre e de termo, assim como células SGHPL-5 foram plaqueadas em fibronectina, Matrigel e sem substrato, respectivamente, e na concentração de 3×10^5 células/mL. Após 48 h, as células foram fixadas em ácido metílico a – 20 °C por 10 min, secas e lavadas com PBS. Na sequência, sítios antigênicos inespecíficos foram bloqueados conforme descrito anteriormente para imunofluorescência e as células incubadas com os anticorpos primários anti-biglicam, anti-TLR-2 e anti-TLR-4. Após uma noite a 4 °C, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos secundários anti-cabra AlexaFluor 488 (células CTEV de primeiro trimestre e SGHPL-5; 1:1000) ou anti-cabra TRITC (células CTEV de termo; 1:100; Sigma-Aldrich) por 1 h em temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com DAPI e as células montadas com *Fluoromount G* em laminula.

4.12 Extração Protéica e Western Blot

Para analisar as expressões protéicas de biglicam, TLR-2 e TLR-4, foram utilizados extratos de placenta total de primeiro trimestre, de células CTEV de primeiro trimestre e de células SGHPL-5. As células foram plaqueadas (3×10^5

células/poço) em fibronectina (1:1, v/v em PBS) ou sem substrato e cultivadas por 24 h em DMEM/F12 acrescido de antibióticos e 10% de SBF. Para avaliação das vias de sinalização, as células CTEV de primeiro trimestre e SGHPL-5 foram lavadas com PBS e passaram uma noite com meio DMEM/F12 sem SBF. Logo após, foram tratadas com 10 µg/mL de biglicam purificado de cartilagem bovina (Sigma-Aldrich) por 15, 30, 45 e 60 min. Em estudos de bloqueio da atividade de receptores, as culturas foram pré-tratadas com 10 µg/mL de anticorpos bloqueadores anti-TLR-2, anti-TLR-4 ou o controle negativo anti-GATA-6 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EUA) por 1 h, antes da adição de biglicam. Os extratos de proteína das placentas e das células foram coletados através de lise por tampão Laemmli (2 ×, dodecil sulfato de sódio a 4%, glicerol a 20%, β-mercaptoetanol a 10%, azul de bromofenol a 0,004% e Tris-HCl a 0,0125 mol/L), contendo um coquetel de inibidores de proteases (P-8340; 1:100; Sigma-Aldrich). Os lisados foram diluídos na razão de 1:1 (v/v) em PBS, aquecidos a 95 °C por 10 min e estocados a – 80 °C. Logo após, os extratos foram separados em géis SDS/PAA a 10% e transferidos em membranas de fluoreto de polivinidileno (Hybond-ECL, RPN303D; Amersham Biosciences; Piscataway, NJ, EUA). O marcador de tamanho molecular utilizado foi o *PageRuler Plus* (ThermoFisher Scientific, Watham, MA, EUA) e a distribuição protéica foi controlada por solução de Ponceau S (Ponceau S a 0,1% e ácido acético a 5% em água destilada). Em seguida realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de leite a 5% em PBS/Tween 0,05% por 1 h, em temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti-biglicam (1:1000), anti-TLR-2 (1:1000), anti-TLR-4 (1:1000), anti-ERK (1:1000; Cell Signaling, Boston, MA, EUA), anti-ERK 1/2 fosforilada (1:1000; Cell Signaling), anti-AKT (1:1000; Abcam), anti-AKT fosforilada treonina (Thr) 308 (1:500; Cell Signaling), anti-AKT fosforilada serina (Ser) 473 (1:500; Cell Signaling) ou anti-EGF-R fosforilada tirosina (Tyr) 1173 (1:1000; Santa Cruz) foram diluídos em PBS/BSA a 5% por uma noite a 4 °C e, para controle, as membranas foram re-incubadas com anticorpo primário anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH; 1:1000; Cell Signaling) seguindo o mesmo protocolo descrito. Após lavagens em PBS/Tween a 0,05%, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-cabra (1:50000; Southern Biotechnology), anti-coelho (1:50000; Amersham Biosciences) ou anti-camundongo (1:50000; Sigma-Aldrich), diluídos em uma solução de leite a 5% em

PBS/Tween 0,05% por 1 h, em temperatura ambiente. Após lavagens em PBS/Tween a 0,05%, a peroxidase foi detectada através de substrato quimioluminescente (ECL Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare) e analisado digitalmente por meio de um sistema de documentação de géis (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA).

4.13 Citometria de Fluxo

As células CTEV de primeiro trimestre e as SGHPL-5 foram plaqueadas (2×10^5 células/poço) e, após 48 h, ressuspendidas em PBS/BSA a 0,5% depois de isoladas das placas de cultura com solução de tripsina a 0,5%. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-biglicam (1:30), anti-TLR-2 (1:67) ou anti-TLR-4 (1:67) em PBS. Para avaliar a proporção de células CTEV expressando estas moléculas, foi realizada dupla marcação utilizando-se o anticorpo anti-HLA-G1 biotinilado (1:100; Exbio). Após 30 min em temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS/BSA a 0,5% e incubadas com os anticorpos secundários anti-cabra Alexa 488 (1:500; Life Technologies) ou anti-estreptavidina conjugada com ficoeritrina (PE) (1:2000; BD Biosciences) em PBS/BSA a 0,5% por 30 min, em temperatura ambiente. Anticorpos não relevantes foram usados como controles. Todos os dados foram adquiridos pelo citômetro de fluxo FACScan (BD Biosciences) e analisados pelo programa FlowJo (TreeStar).

4.14 Ensaio de Proliferação

Células CTEV de primeiro trimestre foram plaqueadas ($2,5 \times 10^4$ células/poço) e, após aderidas ao substrato de fibronectina (1:1 em PBS, v/v), foram pré-tratadas com 10 µg/mL dos anticorpos anti-TLR-2 e anti-TLR-4 para bloquear a atividade dos respectivos receptores, por 1 h, a 37 °C. Logo após, 10 µg/mL de biglicam e 10 µmol/mL de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrDU; Roche, Indianapolis, IN, EUA) foram acrescentados à cultura e incubados por uma noite, a 37 °C. As células foram então fixadas em álcool etílico 70% acrescido de 15 mM de glicina por 20 min a – 20 °C e imunocoradas para CK-7 conforme descrito no item 4.11. Ao término, cinco campos

de cada poço ($\times 400$) foram analisados para avaliar a proporção de células BrDU/CK-7 positivas.

4.15 Ensaios de Migração e Invasão de SGHPL-5

As células SGHPL-5 foram plaqueadas ($0,25 \times 10^5$ células/poço) em câmaras bipartites do tipo Transwell de poros de 8 μm (Millicell, Millipore) revestidas de Matrigel (1:1 em DMEM/F12, v/v) ou sem substrato, para os ensaios de invasão e migração, respectivamente. Ambos os ensaios foram realizados adicionando 300 μL de meio DMEM/F12 sem soro no compartimento inferior do inserto e 250 μL no compartimento superior. Em seguida, foram adicionados por 1h, a 37 °C, 10 mg/mL dos anticorpos anti-TLR-2, anti-TLR-4 ou do anticorpo não relevante GATA-6 como controle, para bloquear a atividade dos respectivos receptores. Biglicam purificado de cartilagem bovina (10 mg/mL) ou biglicam humano recombinante (10 mg/mL, R&D Systems) foram então adicionados às culturas e incubados por 24 h a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas em PBS, fixadas em álcool metílico por 10 min a -20 °C, lavadas novamente e incubadas com DAPI (1:1000 em PBS) por 10 min, em temperatura ambiente. As células presentes na face superior do inserto foram gentilmente retiradas com o uso de um cotonete e as membranas dos insertos foram cortadas com o auxílio de um bisturi, sendo montadas com Fluoromount G em lamínulas. As células presentes em cinco campos de cada membrana foram contadas ($\times 200$) e analisadas digitalmente. A porcentagem de invasão foi calculada através da comparação da quantidade de células nas membranas controles e nas tratadas.

4.16 Ensaios de Invasão das CTEV de Primeiro Trimestre

As células CTEV foram plaqueadas ($0,5 \times 10^5$ células/poço) em câmaras bipartites do tipo Transwell de poros de 12 μm (Millicell, Millipore) revestidas de fibronectina (1:1 em PBS, v/v) e 300 μL e 250 mL de meio DMEM/F12 sem soro foram adicionados nos compartimentos inferior e superior, respectivamente. Após a adesão das células, foram adicionados 10 mg/mL dos anticorpos anti-TLR-2, anti-TLR-4 ou do anticorpo não relevante GATA-6 como controle, para bloquear a

atividade dos respectivos receptores por 1 h, a 37°C. Logo após, 10 mg/mL de biglicam purificado foi adicionado às culturas e incubado por 48 h, a 37 °C. As células presentes na face superior do inserto foram então gentilmente retiradas com o uso de um cotonete e as membranas dos insertos foram cortadas com o auxílio de um bisturi. As células presentes nas membranas dos insertos foram lavadas em PBS, fixadas em álcool metílico por 10 min a – 20 °C, lavadas novamente e marcadas para CK-7 como descrito no **item 4.11**. Ao final, as células CK-7 positivas presentes em cinco campos de cada membrana foram contadas ($\times 200$) e analisadas digitalmente. A porcentagem de invasão foi calculada através da comparação da quantidade de células CK-7 positivas nas membranas controles e nas tratadas.

4.17 Ensaios de Invasão das Células CTEV de Termo

As células CTEV foram plaqueadas ($5,4 \times 10^4$ células/poço) em câmaras bipartites do tipo Transwell de poros de 8 μ m (BD Biosciences) revestidas de Matrigel (1:1 em DMEM/F12, v/v) e 500 mL e 250 mL de meio DMEM/F12 sem soro foram adicionados nos compartimentos inferior e superior, respectivamente. Após a adesão das células, foram adicionados os pré-tratamentos com 10 mg/mL dos anticorpos anti-TLR-2, anti-TLR-4 para bloquear a atividade dos respectivos receptores por 1 h, a 37 °C. Logo após, 10 mg/mL de biglicam purificado foi adicionado às culturas e incubado por 48 h, a 37 °C. Após as 48 h, as células presentes na face superior do inserto foram gentilmente retiradas com o uso de um cotonete e fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS, por 20 min. As células foram coradas com solução de cristal violeta a 0,2% em álcool metílico por 45 min e lavadas exaustivamente em PBS. Células ou prolongamentos citoplasmáticos visualizados na face inferior dos insertos foram contados em 7 campos ($\times 200$). A porcentagem de invasão foi calculada através da comparação da quantidade de células nas membranas controles e nas tratadas.

4.18 Ensaio de Translocação de NFkB

Para o ensaio de translocação de NFkB, células SGHPL-5 foram plaqueadas (3×10^5 células/poço) e, após 24 h de cultura, 10 μ g/mL de biglicam purificado ou 10

ng/mL de TNF- α foram adicionados e mantidos na cultura por 30 min a 37 °C. Logo após, as células foram fixadas em álcool metílico por 10 min a – 20 °C, lavadas novamente e marcadas para a subunidade p65 do NFkB (10 μ g/mL; Santa Cruz) como descrito no **item 4.11**. Ao final, o padrão de marcação do NFkB-p65 foi analisado para determinar a ocorrência ou não de translocação nuclear.

4.19 Documentação Fotográfica e Análise Digital

Os experimentos realizados com células SGHPL-5 e células CTEV de primeiro trimestre foram visualizados em microscópio de fluorescência Olympus BX50 (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Alemanha) e analisados com o auxílio do programa CellP (Olympus Soft Imaging Solutions). As contagens celulares foram realizadas com o programa de domínio público ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os experimentos realizados com células CTEV de termo foram visualizados em microscópio de fluorescência Axioscop 2 (Zeiss) e as imagens capturadas pelo programa AxioVision (Zeiss).

4.20 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando teste comparativo múltiplo de Student-Newman-Keuls utilizando o programa Prism® (GraphPad). A distribuição de Gauss e a igualdade das variâncias foram examinadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Valores estatisticamente significantes foram considerados quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Células CTEV de Placa Basal de Placentas a Termo como Modelos Experimentais

5.1.1 Caracterização e Pureza

A quantidade de células CTEV isoladas de placa basal de placentas a termo foi de 2 a 10×10^6 células por 20 g de tecido. Logo após a separação das células, estas apresentaram morfologia homogênea, apresentando-se pequenas e arredondadas com núcleos grandes e nucléolos proeminentes (Fig. 1A). Não foram visualizadas células multinucleadas ou ST. Essas células não aderiram ao plástico das placas de cultura ou a lamínulas de vidro, mas rapidamente aderiram ao Matrigel ou fibronectina. Após 24 h de cultura, as células apresentaram rápido crescimento de citoplasma e passaram a se agrupar, formando estruturas similares a colunas (Fig. 1B e C). Depois de 48 h de cultura, as células apresentaram um perfil morfológico mais heterogêneo, no qual muitas células mantiveram as características descritas anteriormente, enquanto outras mais distantes dos agrupamentos celulares, apresentavam maiores dimensões citoplasmáticas e projeções citoplasmáticas (Fig. 1 D-F), sugerindo um fenótipo migratório.

As células foram caracterizadas para CK-7 e Vm, marcadores de células de linhagem ectodérmica e mesodérmica, respectivamente, sendo que a maioria das células isoladas foram positivas para CK-7 (Fig. 2A), enquanto poucas células foram imunoreativas para Vm (Fig. 2B). Através de citometria de fluxo, observamos que cerca de 95 % das células eram CK-7 positivas após os procedimentos de isolamento realizados (Fig. 2C). Para comprovar a pureza da preparação, as células foram também marcadas para CD68, marcador de monócitos/macrófagos, o qual apresentou-se praticamente ausente das preparações (dados não mostrados). As expressões de PIGF e PIAP, marcadores de células de linhagem trofoblástica, também foram pesquisadas. A proporção encontrada de células reativas a estes anticorpos foi similar à reatividade para CK-7 (Fig. 2D e E).

A caracterização das células isoladas como CTEV foi complementada utilizando-se um painel de moléculas conhecidas como marcadores de células CTEV, tais como: HLA-G1 e as integrinas $\alpha 1$ e $\alpha 5$. Grande parte das células isoladas mostraram-se reativas a estes anticorpos (Fig. 2F-H). A porcentagem de células reativas para estas moléculas foi calculada e comparada à porcentagem de

reatividade em células CTEV de primeiro trimestre e estão resumidas na Tabela 2. Estes procedimentos mostraram que células CTEV de primeiro trimestre e as células isoladas e cultivadas em nossos procedimentos exibiam porcentagens similares, o que sugeria tratar de populações equivalentes, nas diferentes etapas da gestação.

Tabela 2: Análise quantitativa de marcadores de CTEV cultivados por 48 h.

	CK-7 (%)	HLA-G1 (%)	Integrina $\alpha 1$ (%)	Integrina $\alpha 5$ (%)
CTEV de placentas a termo	95 $\pm$ 3	72 $\pm$ 7	52 $\pm$ 9	53 $\pm$ 16
CTEV de placentas de primeiro trimestre	94 $\pm$ 5	71 $\pm$ 9	64 $\pm$ 3	78 $\pm$ 7

Um total de 200 células DAP-I positivas foram contadas em quatro campos aleatórios (aumento de 200 x) por lâmina (n = 3). Nos mesmos campos e utilizando os filtros apropriados, células duplo-positivas para CK-7 e HLA-G1, integrina $\alpha 1$ ou integrina $\alpha 5$ foram contadas. Os valores foram expressos em porcentagem do total de células DAP-I positivas de acordo com Pollheimer et al. (2011).

5.1.2 Viabilidade e Expressão de RNAm

Os prováveis efeitos negativos do método de separação das células no âmbito de sua viabilidade foram analisados. Pelos métodos de exclusão pelo azul de Trypan e pela incorporação de PI, observou-se que a viabilidade das células isoladas era de 85% e 75%, respectivamente (Fig. 3A e B). Para analisar os efeitos das condições de cultura na viabilidade celular, as mesmas foram analisadas após 24 e 48 h de cultivo em dois tipos diferentes meios de cultura: DMEM/F12 completo e IMDM. Com o meio DMEM/F12, a viabilidade celular foi da ordem de 70% durante as 48 h de cultura, quando analisadas pela incorporação de PI (Fig. 3A). Quando analisadas pela exclusão de Trypan, observou-se variação na viabilidade celular, sendo de 90% após 24 de cultura e de 85% após 48 h (Fig. 3A). Quando cultivadas com IMDM, a viabilidade foi da ordem de 75% durante as 48 h de cultura (Fig. 3B), quando analisadas pela incorporação de PI, enquanto que na análise de exclusão por Trypan, a viabilidade foi em torno de 90% durante este mesmo período (Fig. 3B).

A expressão de RNAm para GAPDH e 18S (*housekeeping*) por RT-PCR, mostrou que as células mantinham níveis equivalentes de expressão durante o

período de cultivo (até 48 h, Fig. 3C). A expressão gênica de MMPs características de células CTEV invasivas, mostrou diferenças. O RNAm da MMP-2 foi expresso durante todos os períodos analisados, enquanto o da MMP-9 após 24h de cultivo (Fig. 3C).

5.1.3 Atividade Proteolítica

Visto que o as células cultivadas expressavam o RNAm das principais MMPs envolvidas no processo de invasão celular, analisamos a atividade destas metaloproteinases em culturas de 48 h por meio de zimografia em gelatina, na presença ou não de EGF - um conhecido promotor de invasão trofoblástica e, de TGF- β - inibidor da migração trofoblástica. As células isoladas apresentaram atividade enzimática de ambas as MMPs (Fig. 4A), sendo possível visualizar, respectivamente, aumento e diminuição da atividade das MMPs quando administrados EGF ou TGF- β (Fig. 4A).

5.1.4 Propriedades Invasivas

Visto que as células isoladas da decidua apresentaram marcadores de células trofoblásticas e de células migratórias/invasivas, expressaram RNAm de MMP-2 e MMP-9 e atividade proteolítica sob diferentes condições, analisamos também as propriedades invasivas destas células por meio de ensaios de invasão em câmaras do tipo Transwell. Assim como nos ensaios de atividade proteolítica estes procedimentos foram realizados na presença de EGF (estimulador) e de TGF- β (inibidor) de invasão em diferentes substratos (Matrigel e fibronectina). As células CTEV foram capazes de invadir ambos os substratos (Fig. 4B e C), a invasão foi modulada negativamente quando TGF- β foi adicionado e positivamente quando EGF foi adicionado ao sistema (Fig. 4B e C).

Fig. 1- Morfologia geral das células isoladas e cultivadas a partir da placa basal decidual de placentas a termo. **A** - Imediatamente após o isolamento. **B** - Células organizadas em colunas após 24h de cultura em Matrigel (x200); **C** - Detalhe de B (x400); **D-F** - Células exibindo projeções indicando atividade migratória; cultura de 48h. (x1000). **A**, Contraste de fase; **B-F**, Coloração: Hematoxilina de Mayer.

Fig. 2- Caracterização e pureza das células isoladas a partir da placa basal decidual de placentas a termo e cultivadas por 48h. **A** - Imunolocalização de CK-7 (x200); o detalhe no canto superior direito mostra uma célula CK-7 positiva exibindo projeções citoplasmáticas (x1000). **B** - Imunolocalização de vimentina. **C** - Citometria de fluxo para CK-7, mostrando a quantidade de células reativas. **D** - Imunolocalização de PIAP (x400); **E** - Imunolocalização de PIGF (x200). **F** - Imunolocalização de HLA-G1 (x200). **G** - Imunolocalização de integrina $\alpha 1$ (x200). **H** - Imunolocalização de integrina $\alpha 5$ (x200).

Fig. 3- Viabilidade celular e expressão de RNAm em células CTEV de placa basal decidual de placentas a termo em diferentes tempos de cultura. A viabilidade celular foi analisada através da incorporação de PI e pelo teste de exclusão pelo corante azul de Trypan. **A** - meio de cultura DMEM/F12 completo. **B** - meio de cultura IMDM. Os dados representam a média $\pm$ DP. **C** - Expressão semi-quantitativa de RNAm para GAPDH, 18S, MMP-2 e MMP-9.

Fig. 4- Atividade invasiva das células CTEV de placa basal decidual de placentas a termo cultivadas por 48 h. **A** - Atividade proteolítica na presença de TGF- β ou EGF em células cultivadas sobre Matrigel. TGF- β e EGF modulam a invasão das células cultivadas em Matrigel (**B**) e em Fibronectina (**C**). Os resultados mostram a média $\pm$ DP. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

5.2 Localização de Biglicam, TLR-2 e TLR-4 em Placentas de Primeiro Trimestre e a Termo

Nas vilosidades coriônicas (VC) de placentas de primeiro trimestre, o biglicam foi encontrado em todos os tipos celulares presentes assim como disperso na MEC (Fig. 5A e B). Nas células trofoblásticas especificamente, o biglicam o padrão de marcação foi predominou na membrana citoplasmática (Fig. 5A e B).

O TLR-2 e o TLR-4 também foram encontrados em todos os tipos celulares presentes nas VC (Fig. 5C e D), embora o TLR-4 não tenha sido observado no ST (Fig. 5E e F).

Na decídua basal (DB) de primeiro trimestre, as células CTEV apresentaram-se fortemente positivas para biglicam, porém sob a forma de grânulos citoplasmáticos (Fig. 6A-D). Além das células CTEV, leucócitos e células endoteliais também foram positivas assim como a MEC ao redor das células deciduais; as células deciduais não foram reativas ao biglicam (Fig. 6A-D).

O TLR-2 foi encontrado em todos os tipos celulares presentes na DB, sendo mais evidente em leucócitos e CTEV (Fig. 6E e F), enquanto o TLR-4 foi somente encontrado em leucócitos e CTEV (Fig. 6G e H).

Nas placentas a termo, o biglicam apresentou positividade em todas as estruturas das VC, em especial na MEC, células de Hofbauer (CH) e no ST (Fig. 7A). Na DB de placentas a termo, o biglicam apresentou padrão de marcação completamente oposto ao encontrado na DB de primeiro trimestre. Apenas leucócitos e células deciduais foram positivas para biglicam (dados não mostrados) e o fibrinoide do tipo matriz; entretanto, a grande maioria das células do CTEV não se apresentaram reativas (Fig. 7B).

Nas vilosidades coriônicas destas placentas, a reatividade ao TLR-2 e ao TLR-4 só foi observada no ST e em algumas células endoteliais e de Hofbauer (Fig. 7C e E). Na DB, ambos TLR-2 e o TLR-4 mantiveram padrões de marcação similares entre si, sendo expressos em leucócitos e em células CTEV (Fig. 7D e F); células deciduais não foram reativas (dados não mostrados).

Fig. 5- Imunofluorescência para biglicam, TLR-2 e TLR-4 em vilosidades coriônicas de placentas de primeiro trimestre. **A** - Imunolocalização de biglicam; **B** - Dupla marcação para biglicam (verde) e CK-7 (vermelho). DAP-I (azul). **C** - Imunolocalização de TLR-2; **D** - Dupla marcação para TLR-2 (verde) e CK-7 (vermelho). DAP-I (azul). **E** - Imunolocalização de TLR-4. **F** - Dupla marcação para TLR-4 (verde) e CK-7 (vermelho). DAP-I (azul). Todas as imagens foram adquiridas em aumento de 200 x. CTV, citotrofoblasto viloso. ST, sinciciotrofoblasto. CTEV, citotrofoblasto extraviloso.

Fig. 6- Imunofluorescência para biglicam, TLR-2 e TLR-4 em placa basal decidual de placentas de primeiro trimestre. **A e C** - Imunolocalização de biglicam (x200 e x400). **B** - Dupla marcação para biglicam (verde) e CK-7 (vermelho). DAP-I (azul) (x200). **D** - Dupla marcação para biglicam (verde) e vimentina (vermelho). DAP-I (azul) (x400). **E** - Imunolocalização de TLR-2 (x200). **F** - Dupla marcação para TLR-2 (verde) e CK-7 (vermelho). DAP-I (azul) (x200); **G** - Imunolocalização de TLR-4 (x200). **H** - Dupla marcação para TLR-4 (verde) e CK-7 (vermelho). DAP-I (azul) (x200). VS, vaso sanguíneo. DEC, célula decidual. G, glândula endometrial. CTEV, citotrofoblasto extraviloso.

Fig. 7- Imunolocalização de biglicam, TLR-2 e TLR-4 em vilosidades coriônicas (coluna da esquerda) e na placa basal decidual (coluna da direita) de placentas a termo. **A e B** - Imunolocalização de biglicam (x200 e x100). **C e D** - Imunolocalização de TLR-2 (x100 e x200). **E e F** - Imunolocalização de TLR-4 (x100 e x200). ST, sinciciotrofoblasto. CTEV, citotrofoblasto extraviloso. CH, célula de Hofbauer.

5.3 Localização de Biglicam, TLR-2 e TLR-4 em Células SGHPL-5 e CTEV de Primeiro Trimestre e de Termo

Através de imunofluorescência, as células SGHPL-5 foram reativas para biglicam (Fig. 8A), TLR-2 (Fig. 8D) e TLR-4 (Fig. 8G), embora a quantidade de células marcadas foi relativamente baixa. Padrão semelhante foi observado nas células CTEV de primeiro trimestre (Fig. 8B, E e H) e de termo (Fig. 8C, F e I). Por meio de citometria de fluxo, identificou-se também a quantidade de células SGHPL-5 e CTEV de primeiro trimestre que apresentam biglicam, TLR-2 e TLR-4 em suas membranas. As células SGHPL-5 mostraram 97,9%, 13,1% e 9,8% de imunoreatividade ao biglicam, TLR-2 e TLR-4, respectivamente (Fig. 9A). Nas células CTEV de primeiro trimestre logo após sua separação, observou-se a média de 50% de células HLA-G1 positivas (Fig. 9B). Desta população celular, 51,2%, 36,6%, e 39,9% das células foram também reativas ao biglicam, TLR-2 e TLR-4, respectivamente (Fig. 9B).

A expressão de biglicam também foi analisada em lisados de VC, de células CTEV de primeiro trimestre cultivadas por 72 h e de células SGHPL-5 também foi analisada por Western Blot, tendo como referência biglicam purificado de cartilagem bovina e biglicam recombinante humano. Todas as células analisadas mostraram biglicam na isoforma de 45 kDa (Fig. 9C), enquanto o biglicam purificado e o recombinante apresentaram uma isoforma de aproximadamente 35 kDa (Fig. 9C).

Os perfis de expressões protéicas de biglicam, TLR-2 e TLR-4 de células CTEV de primeiro trimestre após 24, 48 e 72 h de cultura foram analisados. O biglicam foi encontrado em duas isoformas distintas, de aproximadamente 38 e 45 kDa em células CTEV cultivadas por 24 e 48h, mas em somente uma isoforma de 45 kDa em células CTEV de 72 h de cultura (Fig. 9D).

Já o TLR-2 mostrou-se em uma banda de aproximadamente 100 kDa com baixa expressão durante todos os períodos de cultura, sendo que após 72 h, nenhuma banda foi visível (Fig. 9E); enquanto o TLR-4 apresentou maior expressão protéica após 24 e 48 h de cultura, embora nenhuma banda foi visível após 72 h (Fig. 9F).

Fig. 8- Imunofluorescência para biglicam, TLR-2 e TLR-4 em células SGHPL-5 (coluna da esquerda), CTEV de placentas de primeiro trimestre (coluna do meio) e CTEV de placentas a termo (coluna da direita). **A, B e C** - Imunolocalização de biglicam (x200 e x100). **D, E e F** - Imunolocalização de TLR-2 (x100 e x200). **G, H e I** - Imunolocalização de TLR-4 (x100 e x200).

Fig. 9- Expressão de biglicam, TLR-2 e TLR-4 em células trofoblásticas. **A** - Citometria de fluxo em células CTEV de primeiro trimestre. **B** - Citometria de fluxo em células CTEV de primeiro trimestre HLA-G1 positivas (duplo positivas nos quadrantes superiores direitos). **C** - *Western Blot* para biglicam em vilosidades coriônicas de primeiro trimestre (VC), células SGHPL-5 (PL-5), células CTEV de primeiro trimestre (CTEV), biglicam solúvel (BGNs) e biglicam recombinante (BGNr). **D** - *Western Blot* para biglicam em células CTEV de primeiro trimestre em diferentes tempos de cultura. **E** - *Western Blot* para TLR-2 em células CTEV de primeiro trimestre em diferentes tempos de cultura; **F** - *Western Blot* para TLR-4 em células CTEV de primeiro trimestre em diferentes tempos de cultura. GAPDH utilizado como controle.

5.4 Efeitos do Biglicam na Proliferação

Utilizando culturas de células CTEV de primeiro trimestre, avaliamos prováveis efeitos do biglicam na capacidade proliferativa destas células por meio de incorporação de BrDU. Nas culturas controle, a taxa de proliferação foi de $25,7\% \pm 7,9$ (Fig. 10), enquanto nas culturas tratadas com biglicam, biglicam/TLR-2 e biglicam/TLR-4, não foram encontradas alterações significantes ($23,1\% \pm 5,6$, $28,4\% \pm 4,3$ e $24,8\% \pm 3,3$, respectivamente) (Fig. 10).

5.5 Efeitos do Biglicam na Migração e Invasão de Células SGHPL-5

Para melhor análise dos resultados, os ensaios controle de migração foram padronizados como representando 100% de migração ($\pm 9,1$). Quando comparados ao controle, os ensaios contendo biglicam purificado apresentaram um aumento significativo na migração das SGHPL-5 ($295\% \pm 64,8$) (Fig. 11A). A taxa de migração basal das células não foi afetada após bloqueio com os anticorpos anti-TLR-2 ($168,1\% \pm 50,5$) e anti-TLR-4 ($117,4\% \pm 15$) (Fig. 11A), mas quando biglicam foi adicionado após o bloqueio com os anticorpos anti-TLR-2 e anti-TLR-4, a migração dependente de biglicam diminuiu significativamente, atingindo níveis próximos ao controle ($179\% \pm 45$ e $129,2\% \pm 28,1$, respectivamente) (Fig. 11A). Para avaliar se o fenômeno observado era dependente da fração Fc dos anticorpos anti-TLRs, o anticorpo não relevante anti-GATA-6 foi utilizado sozinho e na presença de biglicam. Observou-se então níveis similares ao controle ($123,9\% \pm 14,6$) e aumento da taxa de migração ($289,1\% \pm 102,5$), respectivamente (Fig. 11A).

Os ensaios de invasão seguiram procedimentos semelhantes, o controle foi representado como 100% de invasão ($\pm 7,5$). Nesses ensaios a adição de biglicam elevou a invasão significativamente ($561,4\% \pm 63,5$) (Fig. 11B) em relação aos controles. De forma semelhante também, a taxa de invasão basal não foi alterada após bloqueio com os anticorpos anti-TLR2 ($142,3\% \pm 30,5$), anti-TLR-4 ($108\% \pm 22,1$) ou uso do anticorpo não relevante anti-GATA-6 ($74,3\% \pm 16,4$) (Fig. 11B). A adição de biglicam após o imunobloqueio com anti-TLR-2 e 4 não induziu aumento da invasão ($204,6\% \pm 64,3$ e $117,4\% \pm 15,5$, respectivamente) (Fig. 11B), ao

contrário da adição de biglicam após o bloqueio com o anticorpo não relevante anti-GATA-6, que promoveu aumento significativo ($385,6\% \pm 134,8$) (Fig. 11B).

Ensaio semelhante foram realizados com biglicam recombinante humano livre de toxinas. Os ensaios controle foram padronizados como sendo 100% de invasão ($\pm 20,2$). Similarmente aos experimentos anteriores observou-se que: i) houve aumento significativo da invasão das células SGHPL-5 ($270,7\% \pm 52,5$) (Fig. 11C); ii) a adição de biglicam recombinante após o bloqueio com os anticorpos anti-TLR-2 ($146,4\% \pm 33,4$) e anti-TLR-4 ($137,8\% \pm 69,5$) não aumentou significativamente a invasão dessas células (Fig. 11C); iii) biglicam após o bloqueio com anti-GATA-6 ($212,9\% \pm 66,8$) (Fig. 11C) elevou significativamente a invasão dessas células.

Visto que os efeitos do biglicam purificado foram maiores do que os efeitos do biglicam recombinante; que os efeitos na migração e na invasão das células não era devido a endotoxinas; e que o bloqueio dos TLRs não era devido à fração Fc dos anticorpos, os experimentos subsequentes foram realizados utilizando-se apenas biglicam purificado e os anticorpos anti-TLR-2 e anti-TLR-4.

5.6 Efeitos do Biglicam na Invasão em CTEV de Primeiro Trimestre e de Termo

A atividade invasiva das células CTEV foi analisada em células do primeiro trimestre e de termo. Em CTEV de primeiro trimestre, a administração de biglicam purificado aumentou significativamente a invasão dessas células ($410\% \pm 73$) (Fig. 12A), enquanto que o imunobloqueio com os anticorpos anti-TLR-2 e anti-TLR-4 manteve os níveis de invasão próximos ao controle ($128,8\% \pm 17,8$ e $112\% \pm 37,7$, respectivamente) (Fig. 12A). A presença de biglicam após o bloqueio não elevou os níveis de invasão celular ($89\% \pm 3,2$ e $118,2\% \pm 33,6$, respectivamente) (Fig. 12A).

Em CTEV de termo, embora as células sejam menos invasivas do que as de primeiro trimestre, porcentagem similares e aumentadas nas taxas de invasão foram encontradas, da ordem de $315\% \pm 95,6$ (Fig. 12B). A taxa de invasão basal não foi alterada pelo imunobloqueio dos receptores TLR-2 ($98,8\% \pm 1,2$) e TLR-4 ($71,4\% \pm 19,1$) (Fig. 12B). No entanto, biglicam adicionado após o bloqueio com anti-TLR-2, levou a uma aumento significativo nos níveis de invasão celular ($231,6\% \pm 53,2$) (Fig. 12B), diferentemente do encontrado em outros modelos. O bloqueio com anti-

TLR-4, no entanto, manteve os níveis de invasão próximos ao controle ($68,3\% \pm 15,9$) (Fig. 12B).

5.7 Sinalização Intracelular Induzida por Biglicam

A primeira via de sinalização investigada foi a via clássica dos TLRs, caracterizada pela fosforilação de ERK 1/2 e translocação de NFkB para o núcleo (Beutler, 2004; Schaefer et al., 2005). Para tal, analisamos a fosforilação de ERK 1/2 em células SGHPL-5 após 15, 30, 45 e 60 min depois do estímulo com biglicam, mas não encontramos nenhuma variação significativa (Fig. 13). As mesmas células foram também analisadas para averiguar se o biglicam era capaz de promover translocação de NFkB para o núcleo, fenômeno visualizado após a adição de TNF- α por 15 e 30 min (Fig. 14A-F); no entanto, a translocação não foi visualizado com a adição de biglicam pelos mesmos períodos de tempo (Fig. 14G-J) ou após 2 e 4 h (dados não mostrados).

A próxima via de sinalização a ser estudada foi a via fosfoinositol 3-kinase (PI3K)/AKT, a principal via ativada na migração/invasão das células trofoblásticas (Knöfler, 2010; Knöfler, Pollheimer, 2012; Pollheimer, Knöfler, 2005); também ativada após estímulo por biglicam em condrócitos articulares humanos (Iacob, Cs-Szabo, 2010). A fosforilação de AKT em dois sítios diferentes: Thr308 e Ser473 foi analisada em células SGHPL-5. Após estímulo com biglicam por 15, 30, 45 e 60 min observou-se aumento de fosforilação de Thr308 e Ser473, com um pico máximo em 30 e 45 min de estímulo, respectivamente (Fig. 15A). Células CTEV de primeiro trimestre estimuladas com biglicam também tiveram seus níveis de fosforilação de Thr308 (principalmente após 30 e 45 min de estímulo) e Ser473 (após 60 min de estímulo) aumentados (Fig. 15B).

Embora fosforilação de AKT possa ocorrer após estímulo de biglicam, esse efeito foi descrito a partir de ativação de EGF-R (Iacob, Cs-Szabo, 2010). Avaliamos então a fosforilação de EGF-R em seu sítio Tyr1173 em células SGHPL-5 após 15, 30, 45 e 60 min de estímulo com biglicam. Contudo não se observou alteração nos níveis de fosforilação em nenhum momento estudado (Fig. 16), evidenciando que o biglicam promove fosforilação de AKT, mas que essa fosforilação não é dependente de fosforilação de EGF-R.

Fig. 10- Perfil da atividade proliferativa das células CTEV de primeiro trimestre duplo-positivas para CK-7 e BrDU, tratadas ou não com biglicam solúvel e tratadas ou não com anticorpos anti-TLR-2 ou anti-TLR-4.

Fig. 11- Análise da motilidade de células SGHPL-5. **A** - Migração de células tratadas ou não com biglicam solúvel e tratadas ou não com anticorpos anti-TLR-2, anti-TLR-4 e anti-GATA-6. * $p < 0,05$ em relação ao não tratado, sem bloqueio. ** $p < 0,05$ em relação ao tratado sem bloqueio. **B** - Invasão de células tratadas ou não com biglicam solúvel e tratadas ou não com anticorpos anti-TLR-2 e anti-TLR-4. * $p < 0,05$ em relação ao não tratado sem bloqueio; ** $p < 0,05$ em relação ao tratado sem bloqueio. **C** - Invasão de células tratadas ou não com biglicam recombinante e tratadas ou não com anticorpos anti-TLR-2, anti-TLR-4 e anti-GATA-6. * $p < 0,05$ em relação ao não tratado; ** $p < 0,05$ em relação ao tratado com biglicam recombinante.

A

B

C

Fig. 12- Análise da motilidade de células CTEV. **A** - Invasão de células CTEV de placentas de primeiro trimestre tratadas ou não com biglicam solúvel e tratadas ou não com anticorpos anti-TLR-2 e anti-TLR-4. * $p < 0,05$ em relação ao não tratado sem bloqueio; ** $p < 0,05$ em relação ao tratado sem bloqueio. **B** - Invasão de células CTEV de placentas a termo tratadas ou não com biglicam solúvel e tratadas ou não com anticorpos anti-TLR-2 e anti-TLR-4. * $p < 0,05$ em relação ao não tratado sem bloqueio. ** $p < 0,05$ em relação ao tratado sem bloqueio.

A

B

Fig. 13- Expressão por *Western Blot* de ERK 1/2 total e fosforilada em células SGHPL-5 tratadas com biglicam solúvel por diferentes períodos. GAPDH utilizado como controle.

Fig. 14- Imunofluorescência para NFkB p65 fosforilada em células SGHPL-5. Células não tratadas (**A e B**), tratadas com TNF- α por 15 minutos (**C e D**) ou 30 minutos (**E e F**) e tratadas com biglicam solúvel(BGNs) por 15 minutos (**G e H**) ou 30 minutos (**I e J**). DAP-I em azul. Todas as imagens adquiridas no aumento de 200x.

Fig. 15- Expressão de AKT total e fosforilada em Thr308 e Ser473. Expressão em células SGHPL-5 **(A)** e células CTEV de primeiro trimestre **(B)** tratadas com biglicam solúvel por diferentes períodos. GAPDH utilizado como controle.

Fig. 16- Expressão de EGF-R fosforilado em células SGHPL-5 tratadas com biglicam solúvel por diferentes períodos. GAPDH utilizado como controle.

5.8 Sinalização Intracelular via AKT Induzida por Ativação de TLR-2 e TLR-4

Excluído o EGF-R como ativador da via AKT nas células trofoblásticas estimuladas por biglicam, analisamos se nas células SGHPL-5, após o bloqueio dos receptores TLR-2 e TLR-4 e a adição de biglicam, a fosforilação de AKT em Thr308 e Ser473 seriam alterados. Observou-se uma evidente diminuição nos níveis de fosforilação de Thr308 (Fig. 17) e uma diminuição ainda maior da fosforilação de Ser473 no grupo biglicam/anti-TLR-4, quando comparado ao grupo biglicam/TLR-2 (Fig. 17), o que indicava que a fosforilação de AKT induzida por biglicam é dependente de TLR-2 e TLR-4.

O bloqueio com anticorpo não relevante seguido da adição de biglicam não alterou a fosforilação de Thr308 ou de Ser473 (dados não mostrados).

5.9 Invasão Induzida Através de Sinalização Intracelular via AKT1

Uma vez que demonstramos que o biglicam induz migração e invasão das células trofoblásticas via interação com o TLR-2 e o TLR-4, e que o biglicam induz fosforilação de AKT através dos mesmos receptores, realizamos um *knockdown* de AKT1 nas células SGHPL-5, as quais foram submetidas a ensaios de invasão e foram divididas em 2 grupos que receberam ou não biglicam: shRNAmir controle e shRNAmir AKT1.

O grupo shRNAmir controle sem biglicam foi padronizado como 100% de invasão ($\pm 14,7$) e quando comparado ao grupo shRNAmir controle que recebeu biglicam, observou-se aumento de invasão semelhante ao observado em experimentos anteriores ($375,5\% \pm 34,5$) (Fig. 18). O biglicam no entanto, não foi capaz de induzir aumento de invasão no grupo shRNAmir AKT1 ($136,6\% \pm 15,4$) (Fig. 18), que não possui AKT1, indicando que o efeito de invasão induzido por biglicam é dependente de AKT1.

Fig. 17- Expressão de AKT total e fosforilada em Thr308 e em Ser473 em células SGHPL-5 tratadas com biglicam solúvel e acrescidas de anticorpos anti-TLR-2 ou anti-TLR-4. GAPDH utilizado como controle.

Fig. 18- Análise da invasão de células SGHPL-5 shRNAmir controle e shRNAmir AKT1 tratadas ou não com biglicam solúvel. * $p < 0,05$ em relação ao shRNAmir controle não tratado. ** $p < 0,05$ em relação ao shRNAmir-controle tratado com biglicam solúvel.

6 DISCUSSÃO

Isolamento e caracterização de células CTEV de placa basal decidual de placentas a termo (Apêndice)

Um importante passo no desenvolvimento do trabalho foi a padronização de uma técnica de cultura primária para isolar células CTEV viáveis e funcionais de placa basal decidual de placentas a termo, nunca antes descrita na literatura.

A caracterização destas células como CTEV isoladas com alto grau de pureza, foi confirmada pelos seguintes marcadores trofoblásticos: citoqueratina-7, PIAP, PIGF, HLA-G1 e integrinas $\alpha 1$ e $\alpha 5$. A viabilidade das células e a expressão gênica para diferentes produtos celulares foi mantida durante a cultura. Ainda, as células isoladas responderam diferentemente a moléculas regulatórias que inibem ou estimulam a atividade invasiva de células trofoblásticas, além da atividade de MMP-2 e MMP-9.

As células CTEV são as únicas células que expressam filamentos de citoqueratina na placa basal decidual de placentas a termo, onde glândulas e células epiteliais de revestimento não se encontram presentes (Frank et al., 2001; Muhlhauser et al., 1995). Assim, a expressão de citoqueratina-7 e a ausência de reatividade para vimentina, como observados aqui, indicam a natureza trofoblástica. A imunolocalização de PIGF, um fator angiogênico placentário expresso por células CTEV de placentas a termo (Khaliq et al., 1996; Vuorela et al., 1997), e de PIAP, uma proteína localizada em sinciciotrofoblasto e em células CTEV de placa basal (Leitner et al., 2001; Potgens et al., 2001), indicam o mesmo.

Dentre todos os marcadores de CTEV, o HLA-G1 é considerado o mais importante e é regulado positivamente em placentas de primeiro trimestre (Kovats et al., 1990; Le Bouteiller, Blaschitz, 1999), enquanto que em placentas a termo, sua expressão pode estar diminuída (McMaster et al., 1995; Shorter et al., 1993). No entanto, a porcentagem de células HLA-G1 positivas na placa basal a termo foi similar à porcentagem em placentas de primeiro trimestre. Outros marcadores importantes de CTEV são as integrinas $\alpha 1$ e $\alpha 5$, as quais estão associadas com o fenótipo invasivo das células CTEV, participando da ligação destas células a importantes moléculas da MEC (Aplin, 1993; Aplin et al., 1999; Damsky et al., 1993; Harris et al., 2009).

Durante as primeiras 48h, as células CTEV mantiveram-se viáveis e ativas, embora não proliferativas. Entretanto, capacidade proliferativa reduzida é comum em células totalmente diferenciadas e o decréscimo gradual da viabilidade é esperado devido a problemas na adaptação ao ambiente da cultura e ausência de prováveis moléculas presentes *in situ* (Orendi et al., 2011; Quenby et al., 2005). Já a ativação de MMPs é muito importante para a invasão das células CTEV de primeiro trimestre (von Rango et al., 2003). Neste estudo, mostramos que durante a cultura primária, as células CTEV isoladas da placa basal de placentas a termo expressam MMP-2 e MMP-9 e apresentam atividade proteolítica, sugerindo que estas enzimas devem desempenhar funções importantes na fisiologia destas células.

Assim como em outros modelos de células trofoblásticas invasivas (Biadasiewicz et al., 2011; Caniggia et al., 1999), as células CTEV da placa basal respondem à administração de TGF- β e EGF, modulando sua atividade invasiva, o que reforça a idéia de que a capacidade de invasão, pode ser abrandada nas fases finais da gestação, mas ainda assim presente se devidamente estimulada. Obviamente, deve-se considerar também que as condições *in vitro* não reproduzem o microambiente da interação materno-fetal em toda a sua complexidade, o que pode ter contribuído para a atividade invasiva observada.

A possibilidade de isolamento das células CTEV de placentas a termo é inestimável para a investigação científica. Além de permitir o estudo de processos invasivos em si, estas células completamente diferenciadas estabelecem contatos *in vivo* e interações funcionais com inúmeros tipos celulares uterinos e imunológicos durante a gestação, abrindo desta forma a possibilidade de estudos *in vitro* sobre os mecanismos reguladores da interação materno-fetal. Sob esta perspectiva são infindáveis as possibilidades que podem ser exploradas com este modelo, inclusive nas muitas patologias placentárias.

Biglicam na interface materno-fetal

Após a padronização da cultura de células CTEV de placentas a termo, o próximo passo foi utilizar essas células, assim como células CTEV de primeiro trimestre, células SGHPL-5 e amostras de placentas de primeiro trimestre e de termo para a localização protéica de biglicam, um importante proteoglicano da MEC com ativo papel na decidualização.

A decidualização é caracterizada por extensa remodelação da MEC, na qual as SLRPs possuem grande importância. Em camundongos, a reação decidual envolve a formação de fibrilas colágenas espessas associadas à redução de decorin e aumento da expressão de biglicam. Nestes locais, o biglicam é secretado por células deciduais maduras e depositado na MEC circundante (San Martin et al., 2003).

Em placentas de primeiro trimestre, o biglicam também foi localizado na MEC ao redor de células deciduais e no interior de células CTEV. Este padrão no entanto, é invertido na placenta a termo, o biglicam foi encontrado na MEC ao redor das células CTEV e no interior das células deciduais. Esse achado indica que o padrão de expressão de biglicam durante a gestação é temporalmente regulado. A análise da distribuição de biglicam sugere que as células deciduais secretam e depositam biglicam na MEC nas fases iniciais da gestação. Durante a fase de invasão trofoblástica, essa produção é reduzida, aparecendo novamente ao final da gestação. Neste contexto, é possível que o biglicam secretado pelas células deciduais desempenhe um papel relevante na regulação da invasão trofoblástica.

Nossos resultados também corroboram os achados de Murthi et al. (2010) e Borbely et al. (2013) que recentemente também mostraram a expressão de biglicam nas células trofoblásticas, células mesenquimais e endoteliais das vilosidades coriônicas de placentas a termo e em células deciduais e no fibrinoide do tipo matriz.

Culturas primárias de CTEV de placentas de primeiro trimestre e de termo e células SGHPL-5 também mostraram-se reativas ao biglicam, embora o padrão de reatividade tenha variado. O biglicam expresso nas colunas celulares das vilosidades coriônicas de primeiro trimestre apresentou-se predominantemente associado à membrana citoplasmática dessas células, enquanto que nas células CTEV da placa basal decidual, citoplasma e membrana citoplasmática mostraram-se reativos. Biglicam citoplasmático foi previamente mostrado em células trofoblásticas em diversas patologias placentárias (placenta acreta, mola invasora e coriocarcinoma), aonde foi correlacionado ao aumento da atividade invasiva destas células (Borbely et al., 2013). Neste estudo, a análise das células CTEV por citometria de fluxo também sugeriu a associação do biglicam com a superfície celular de um número considerável de células CTEV HLA-G1⁺, talvez fazendo parte de algum complexo multiprotéico.

Nossos resultados também mostraram a presença de duas isoformas de biglicam de aproximadamente 38 e 45 kDa nos lisados de células do CTEV, o que corrobora alguns estudos anteriores (Fisher et al., 1999; Johnstone et al., 1993; Tufvesson et al., 2002; Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2003). A isoforma predominante nas células trofoblásticas entretanto, foi a de 45 kDa encontrada nos extratos de vilosidades coriônicas de primeiro trimestre, células SGHPL-5 e CTEV de primeiro trimestre após 24 e 48 h de cultura. É possível que esta forma esteja estreitamente associada ao processo de regulação da invasão trofoblástica, uma vez que é a isoforma expressa no biglicam solúvel e no recombinante, utilizados nos ensaios de migração e invasão em células SGHPL-5 e CTEV de ambos períodos gestacionais.

Em todas as células utilizadas, a invasão e migração aumentaram substancialmente quando o biglicam foi adicionado, concordando com estudos realizados em outras células (Kinsella et al., 1997; Shimizu-Hirota et al., 2004; Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2003).

Em suma, células CTEV sintetizam e secretam duas isoformas de biglicam. Uma parece permanecer aderida à membrana citoplasmática, muito possivelmente desempenhando atividades regulatórias. Outra, é secretada e depositada na MEC, podendo participar da invasão destas células. A associação entre células CTEV e o biglicam sugere que este proteoglicano possa também modular funções nestas células. Estudos prévios mostram que além do controle da fibrillogênese (Schaefer et al., 2010), o biglicam pode promover sinalização intracelular através de diferentes receptores, como os TLR-2 e TLR-4 (Babelova et al., 2009; Derbaly et al., 2010; Schaefer et al., 2005; Popovic et al., 2011) e induzir aumento da motilidade celular em diversos modelos (Kinsella et al., 1997; Shimizu-Hirota et al., 2004; Tufvesson, Westergren-Thornsson, 2003).

Atividade migratória e/ou invasiva das células trofoblásticas induzida por biglicam e mediada por TLR-2 e 4

Neste estudo investigamos também se a ligação do biglicam com células CTEV é mediada por TLR-2 e TLR-4 e se essa ligação induz a um aumento do comportamento migratório e/ou invasivo destas células.

Estudos prévios levaram à proposta elaborada por Babelova et al. (2009) de que danos teciduais ou ativação celular levariam à secreção de biglicam solúvel, diferente estrutural e funcionalmente da sua forma ligada à MEC. Entretanto, o mecanismo exato desta mudança estrutural não está estabelecido, assim como as funções exercidas pelo biglicam e outras DAMPs durante a inflamação estéril.

Na placenta, TLR-2 e TLR-4 foram previamente identificados em células trofoblásticas de placentas de primeiro e terceiro trimestres de gestação (Holmlund et al., 2002), associados a processos inflamatórios e infecciosos (Abrahams et al., 2004; Abrahams et al., 2005; Koga, Mor, 2010). Em nosso estudo, mostramos ainda que estes receptores são diferencialmente expressos em células CTEV da placa basal decidual de placentas de primeiro trimestre e termo (*in situ* e *in vitro*) e em células SGHPL-5, independentemente desses processos.

Além da localização dos TLRs, também analisamos um possível papel desses receptores na migração e invasão trofoblástica na presença de biglicam. Nossos resultados mostraram que em todas as células estudadas, os bloqueios de TLR-2 ou de TLR-4 aboliram os efeitos migratórios/invasivos provocados pelo biglicam, indicando que os efeitos pró-motilidade eram mediados por estes receptores. Outras DAMPs ligantes de TLR-2 e TLR-4 foram já descritas como reguladoras de migração ou invasão em diferentes modelos de estudo, como no caso da HMGB-1 e do versicam, que se ligam aos TLR-2 e TLR-4, promovendo regulação da migração e invasão (Dai et al., 2010; Kim et al., 2009; Saber et al., 2011). Em conjunto com nossos achados, estes dados reforçam a hipótese de que TLRs são mais do que meramente receptores da imunidade inata e de que as DAMPs são mais do que moléculas capazes de produzir inflamação estéril, sendo ambas capazes de regular a motilidade das células de maneira fisiológica ou patológica. Neste estudo, os TLRs mostraram-se peças fundamentais na motilidade trofoblástica dependente de biglicam. O imunobloqueio de TLR-2 e TLR-4 reduziu a níveis basais os efeitos pró-migratórios e pró-invasivos do biglicam nas diferentes células trofoblásticas. A manutenção dos níveis basais de invasão e migração após este bloqueio, entretanto, sugere que este não é o único fator regulador dos processos de motilidade do trofoblasto. Neste contexto, inúmeros trabalhos na literatura tem mostrado que estas atividades trofoblásticas de migração e invasão estão alicerçadas em diferentes mecanismos para garantirem a manutenção da gestação (Chakraborty et al., 2002; Knöfler, 2010; Knöfler, Pollheimer, 2012).

Para verificar se os efeitos de aumento de invasão e migração foram provocados indiretamente por aumento do número de células por aumento da proliferação das mesmas, utilizamos células CTEV de primeiro trimestre incorporadas por BrDU, já que o biglicam é também um conhecido regulador de proliferação em outros tipos celulares (Inkson et al., 2009; Ward et al., 2011). No entanto, nenhuma alteração na proliferação de células CTEV pode ser observada em nossos experimentos, ou seja, o aumento de migração e invasão estão diretamente relacionados com a adição de biglicam.

Neste estudo, a presença de biglicam endógeno presente na superfície das células trofoblásticas conforme observado nos preparados imuno-histoquímicos, em imunofluorescência e em citometria de fluxo, pareceu não desempenhar as mesmas atividades biológicas observadas pelo biglicam exógeno. Os efeitos observados na adição de biglicam *in vitro* não foram observados na sua ausência, apesar da presença de biglicam na superfície destas células. Estas moléculas tampouco foram encontradas no meio condicionado das culturas trofoblásticas, o que contribuiria para uma possível função secretora (dados não mostrados). Neste contexto, várias possibilidades podem ser especuladas, a saber:

i) A isoforma de biglicam associada à membrana citoplasmática pode apresentar baixa afinidade aos TLRs. Ressalta-se que a expressão de diversas isoformas de biglicam geradas por *splicing* alternativo ou modificações nas cadeias de glicosaminoglicanos podem ter importância biológica diversa (Tufvesson et al., 2002). Muitas destas isoformas são conhecidas, mas suas funções não foram ainda elucidadas.

ii) A isoforma de biglicam associada à membrana citoplasmática pode estar fazendo parte de um complexo multiprotéico com outras funções que não a de induzir invasão.

iii) A concentração de biglicam solúvel *in vitro* pode não ser alta o suficiente para gerar efeitos autócrinos ou parácrinos mensuráveis.

iv) A secreção de biglicam para o meio extracelular pode ser dependente de algum fator *in situ* não mimetizado *in vitro*.

v) A presença de biglicam livre no sobrenadante poder ter sido mascarada por sua alta afinidade a fatores de crescimento também presentes nos sobrenadantes das culturas de trofoblasto (Hildebrand et al., 1994; Inkson et al., 2009; Miyazaki et al., 2008; Tufvesson et al., 2002).

vi) As células em cultura secretam biglicam para o sobrenadante, mas este pode ser rapidamente clivado por MMPs específicas (Calabrese et al., 2012).

Estudos voltados a este aspecto da sinalização mediada pelo biglicam necessitam ser melhor estudados em um futuro próximo.

Vias de sinalização do biglicam

Um passo adicional desse estudo foi identificar a via de sinalização utilizada pelo biglicam para estimular a motilidade das células trofoblásticas. Evidências prévias mostraram que o biglicam tende a sinalizar por ERK quando se liga aos TLRs ou ao EGF-R (Iacob, Cs-Szabo, 2010; Schaefer et al., 2005; Wang et al., 2010), translocando NFkB para o núcleo (Schaefer et al., 2005). O receptor para EGF-R, outro possível receptor do biglicam, não sofreu fosforilado após adição do proteoglicano (Iacob, Cs-Szabo, 2010). De forma semelhante, a presença de biglicam nas células SGHPL-5 também não resultou em fosforilação de ERK ou translocação de NFkB para o núcleo.

Como os TLRs são predominantemente associados às suas funções imunológicas, poucos relatos estão disponíveis sobre outras possíveis vias de sinalização, que não a clássica via ERK. Recentemente entretanto, mostrou-se que TLR-2 e TLR-4 podem induzir a ativação de PI3K e AKT (Fallah et al., 2011; Lee et al., 2011; Santos-Sierra et al., 2009) como uma alternativa não-clássica da ativação mediada por estes receptores, como por exemplo a via de sinalização de biglican em condrócitos articulares humanos (Iacob, Cs-Szabo, 2010). Coincidentemente, esta via de sinalização tem sido considerada fundamental na regulação da migração/invasão das células trofoblásticas (Knöfler, 2010; Knöfler, Pollheimer, 2012; Pollheimer, Knöfler, 2005).

Ao estudarmos a via de sinalização PI3K/AKT nas células trofoblásticas observamos que ambos os sítios de fosforilação da AKT, Thr308 e Ser473 foram ativados após estímulo por biglicam, sugerindo que esta via está relacionada com o aumento de migração e invasão biglicam-dependentes. Este achado desta forma aumenta o leque de fatores relacionados à ativação de PI3K/AKT na motilidade trofoblástica, previamente demonstrado em função de moléculas como Wnt, gonadotrofina coriônica (hCG), EGF e IGF-II (fator de crescimento semelhante a

insulina II), entre outras (Cartwright et al., 2002; Knöfler, 2010; Prast et al., 2008; Qiu et al., 2004; Qiu et al., 2005; Sonderegger et al., 2010).

A ativação de AKT por diversos fatores de crescimento tem sido descrita como mediada pela fosforilação de ambos os resíduos Thr308 e Ser473 (Jacinto et al., 2006), os quais fosforilam o alvo do complexo 1 de rapamicina em mamíferos (mTORC1), também descrito como promotor de invasão trofoblástica (Busch et al., 2009; Qiu et al., 2004).

Nossos ensaios mostraram que a fosforilação de AKT foi abolida quando TLR-2 ou TLR-4 foi bloqueado, indicando que a ação de biglicam é dependente dos TLRs para induzir fosforilação de AKT em qualquer dos resíduos analisados (Ser473 e Thr308). Neste contexto, biglicam pode ser considerado uma nova molécula capaz de promover a regulação da motilidade trofoblástica através da via PI3K/AKT.

Vários efeitos *downstream* da fosforilação de AKT podem estar envolvidos no aumento da migração e invasão do trofoblasto, entre elas o aumento da expressão de MMPs e a formação de adesões focais e fibras de estresse (Elustondo et al., 2006; Kabir-Salmani et al., 2003; Prast et al., 2008; Qiu et al., 2004; Sonderegger et al., 2010). A expressão de MMPs e a ação proteolítica das células trofoblásticas sob ação de biglicam neste estudo corroboram a ativação desta via de sinalização.

Dentre os membros da família AKT, a AKT1 é a principal molécula associada à regulação fisiológica da migração celular (Zhou et al., 2006), representando aproximadamente 45% do total de AKT expresso nas células trofoblásticas (Pollheimer et al., 2011). Neste estudo, o envolvimento da via AKT na invasão mediada por biglicam, também foi avaliada utilizando-se células SGHPL-5 expressando de forma estável shRNAmir-AKT1, o qual abole completamente a expressão protéica de AKT1 (Bilban et al., 2009; Pollheimer et al., 2011). Nossos resultados confirmaram que a ausência de AKT1 impede o efeito invasivo mediado pelo biglicam enfatizando o papel desta via na motilidade trofoblástica biglicam-dependente.

No contexto de nossos achados, podemos também hipotetizar que a perda de expressão de biglicam pode afetar negativamente as funções trofoblásticas, incluindo sua motilidade. Coerentemente com esta hipótese, estudos tem mostrado que níveis reduzidos de biglicam encontrados na restrição de crescimento idiopático podem participar da patogênese dessa patologia, frequentemente associada com insuficiência placentária, falhas de invasão trofoblástica e remodelamento vascular

deficiente das artérias espiraladas (Gagnon et al., 2003; Murthi et al., 2010). Ao contrário, a relação aumentada de biglicam nas patologias invasivas, como placenta acreta, mola invasora e coriocarcinoma (Borbely et al., 2013) pode estar associada a alterações nos mecanismos de regulação e, conseqüentemente, manutenção da invasividade trofoblástica.

Em conjunto, este estudo propõe uma nova via de sinalização para o biglicam, que inclui a sua ligação ao TLR-2 ou TLR-4, ativação de AKT e indução de migração e invasão trofoblástica. Nossos dados podem ajudar a elucidar vias não-clássicas e outras funções dos TLRs, assim como das DAMPs. Além disso, o biglicam se destaca como potente indutor de invasão trofoblástica e, abrindo desta forma novas possibilidades de estudo para a compreensão da biologia das células trofoblásticas e da fisiologia e patologias placentárias.

7 CONCLUSÕES

- 1- O isolamento de células CTEV da placa basal decidual de placentas a termo é uma alternativa viável para estudos *in vitro*.
- 2- As expressões e co-localizações de biglicam, TLR-2 e TLR-4 nas vilosidades coriônicas e na placa basal decidual de placentas de primeiro trimestre e de termo, principalmente em células CTEV, é coerente com um papel funcional para estas moléculas na fisiologia dessas células.
- 3- O biglicam não afeta a proliferação de células trofoblásticas.
- 4- O biglicam induz migração e invasão nas células trofoblásticas e esses efeitos são dependentes de sua ligação ao TLR-2 ou TLR-4.
- 5- A via de sinalização do biglicam mediada por TLR-2 e TLR-4 em células trofoblásticas não é a via clássica dos TLRs.
- 6- A ligação de biglicam aos TLR-2 e TLR-4 leva à ativação de AKT1 por ambos os sítios de fosforilação Ser473 e Thr308 nas células trofoblásticas.
- 7- O biglicam atua como molécula reguladora da motilidade trofoblástica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB, Guller S, Romero R, Mor G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J Immunol.* 2005;175(12):8096-104.

Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol.* 2004;173(7):4286-96.

Abrahamsohn PA, Zorn TMT, Oliveira SF. Decidua in rodents, In: Glasser R, Aplin JD, Giudice LC, Tabibzadeh S, editors. *The Endometrium*. London: Taylor & Francis Group; 2002; p. 273-9.

Aldebert D, Diallo M, Niang M, Sarr D, Cisse C, Moreau JC, Jambou R. Differences in circulating dendritic cell subtypes in peripheral, placental cord blood in African pregnant women. *J Reprod Immunol.* 2007;73(1):11-9.

Aplin JD, Jones CJP. Extracellular matrix in endometrium and decidua. In: Genbacev O, Klover A, Beaconsfield R. *Placenta as a model and a source*. London: Plenum Publishing Corporation; 1989 p. 115-28.

Aplin JD, Lacey H, Haigh T, Jones CJ, Chen CP, Westwood M. Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion. *Biochem Soc Trans.* 2000;28:199-202.

Aplin JD. Expression of integrin alpha6beta4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta.* 1993;14:203-15.

Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 2000;192(2):259-70.

Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF, Bruckner P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Grone HJ, Schaefer L. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem.* 2009;284:24035-24048.

Baker SM, Sugars RV, Wendel M, Smith AJ, Waddington RJ, Cooper PR, Sloan AJ. TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calcif Tissue Int.* 2009;85(1):66-74.

Baldassare JJ, Bi Y, Bellone CJ. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J Immunol.* 1999;162(9):5367-73.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2013 Jul 18].

Baroni T, Carinci P, Belluci C, Lili C, Becchetti E, Carinci F, Stabellini G, Pezzeti F, Caramelli E, Tognon M, Bodo M. Cross-talk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta3 regulates extracellular matrix production by human fibroblasts from subjects with non-syndromic cleft lip and palate. *J Periodontol.* 2003;74(10):1447-53.

Beijar EC, Mallard C, Powell TL. Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. *Placenta.* 2006;27(2-3):322-6.

Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. Pathology of the human placenta. New York: Springer-Verlag; 2006.

Berendsen AD, Fisher LW, Kilts TM, Owens RT, Robey PG, Gutkind JS, Young MF. Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(41):17022-7.

Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature.* 2004;430:257-63.

Bi Y, Nielsen KL, Kilts TM, Yoon A, Karsdal M, Wimer HF, Greenfield EM, Heegaard AM, Young MF. Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone.* 2006;38(6):778-86.

Biadasiewicz K, Sonderegger S, Haslinger P, Haider S, Saleh L, Fiala C, Pollheimer J, Knöfler M. Transcription factor AP-2alpha promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology.* 2011;152:1458-69.

Bidanset DJ, LeBaron R, Rosenberg L, Murphy-Ullrich JE, Hook M. Regulation of cell substrate adhesion: effects of small galactosaminoglycan-containing proteoglycans. *J Cell Biol.* 1992;118:1523-31.

Bilban M, Haslinger P, Prast J, Klinglmüller F, Woelfel T, Haider S, Sachs A, Otterbein LE, Desoye G, Hiden U, Wagner O, Knöfler M. Identification of novel trophoblast invasion-related genes: heme oxygenase-1 controls motility via peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Endocrinology.* 2009;150(2):1000-13.

Bishof P, Friedli E, Martelli M, Campana A. Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell adhesion and immunopurification. *Amer J Obstet Gynecol.* 1991;165:1791-801.

Borbely AU, Daher S, Ishigai MM, Mattar R, Sun SY, Knöfler M, Bevilacqua E, Oliveira SF. Decorin and biglycan immunolocalization in nonvillous structures of healthy and pathological human placentas. *Histopathol J.* 2013. In press.

Bowe MA, Mendis DB, Fallon JR. The small leucine-rich proteoglycan biglycan binds to α -dystroglycan and is upregulated in dystrophic muscle. *Journal of Cell Biology*. 2000;148:801-10.

Boyd JD, Hamilton WJ. *The Human Placenta*. Heffer, Cambridge; 1970.

Busch S, Renaud SJ, Schleussner E, Graham CH, Markert UR. mTOR mediates human trophoblast enzymes and is associated with serine phosphorylation of STAT3. *Exp Cell Res*. 2009;315(10):1724-33.

Calabrese GC, Gazzaniga S, Oberkersch R, Wainstok R. Decorin and biglycan expression: its relation with endothelial heterogeneity. *Histol Histopathol*. 2011;26(4):481-90.

Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JWK, Lye SJ, Letarte M. Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. *Endocrinology*. 1997;138:4977-88.

Cartwright JE, Tse WK, Whitley GS. Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase. *Exp Cell Res*. 2002;279:219-26.

Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A célula*. São Paulo: Manole; 2001.

Castelucci M, Crescimanno C, Schröter CA, Kaufmann P, Mühlhauser J. Extravillous trophoblast: immunohistochemical localization of extracellular matrix molecules. In: Genazzani AR, Petraglia F, Genazzani AD, editors. *Frontiers in gynecologic and obstetric investigation*. New York: Parthenon publishing group; 1993. p. 19-25.

Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002;80(2):116-24.

Chen CP, Liu SH, Lee MY, Chen YY. Heparan sulfate proteoglycans in the basement membranes of the human placenta and decidua. *Placenta*. 2008;29(4):309-16.

Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(10):1271-85.

Chieppa M, Bianchi G, Doni A, Del Prete A, Sironi M, Laskarin G, Monti P, Piemonti L, Biondi A, Mantovani A, Introna M, Allavena P. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol*. 2003;171(9):4552-60.

Church HJ, Vićovac LM, Williams JD, Hey NA, Aplin JD. Laminins 2 and 4 are expressed by human decidual cells. *Lab Invest*. 1996;74:21-32.

Clark JW. Biological response modifiers. *Cancer Chemother Biol Response Modif.* 1999;18:223-38.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420:885-91.

Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR. Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2003;50:316-21.

Dai S, Sodhi C, Cetin S, Richardson W, Branca M, Neal MD, Prindle T, Ma C, Shapiro RA, Li B, Wang JH, Hackam DJ. Extracellular high mobility group box-1 (HMGB1) inhibits enterocyte migration via activation of Toll-like receptor-4 and increased cell-matrix adhesiveness. *J Biol Chem.* 2010;285:4995-5002.

Dallenbach-Hellweg G, Sievers S. The histological reaction of the endometrium to gestagens applied locally. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1975;368:289-98.

Damsky C, Sutherland A, Fisher S. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. *FASEB J.* 1993;7:1320-9.

Derbali H, Bosse Y, Cote N, Pibarot P, Audet A, Pepin A, Arsenault B, Couture C, Despres JP, Mathieu P. Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2. *Am J Pathol.* 2010;176:2638-45.

Diaz LE, Chuan YC, Lewitt M, Fernandez-Perez L, Carrasco-Rodriguez S, Sanchez-Gomez M, Flores-Morales A. IGF-II regulates metastatic properties of choriocarcinoma cells through the activation of the insulin receptor. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(8):567-76.

Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Cutolo M, Todesco S. Estrogens in pregnancy and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1069:247-56.

Douglas T, Heinemann S, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H. Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules.* 2006;7(8):2388-93.

Elustondo PA, Hannigan GE, Caniggia I, MacPhee DJ. Integrin-linked kinase (ILK) is highly expressed in first trimester human chorionic villi and regulates migration of a human cytotrophoblast-derived cell line. *Biol Reprod.* 2006;74:959-68.

Enders AC. Cytodifferentiation of trophoblast in the anchoring villi and trophoblastic shell in the first half of gestation in the macaque. *Microsc Res Tech.* 1997a;38:3-20.

Enders AC. Transition from lacunar to villous stage of implantation in the macaque, including establishment of the trophoblastic shell. *Acta Anat (Basel)*. 1995;152:151-69.

Equils O, Lu D, Gatter M, Witkin SS, Bertolotto C, Arditi M, McGregor JA, Simmons CF, Hobel CJ. Chlamydia heat shock protein 60 induces trophoblast apoptosis through TLR4. *J Immunol*. 2006;177(2):1257-63.

Fallah MP, Chelvarajan RL, Garvy BA, Bondada S. Role of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway in the age-related cytokine dysregulation in splenic macrophages stimulated via TLR-2 or TLR-4 receptors. *Mech Ageing Dev*. 2011;132:274-86.

Fedarko NS, Termine JD, Young MF, Gehron Robey P. Temporal regulation of hyaluronan and proteoglycan metabolism by human bone cells in vitro. *J Biol Chem*. 1990;265:12200-9.

Feinberg RF, Kliman HJ, Wang CL. Transforming growth factor beta stimulates trophoblast oncofetal fibronectin synthesis *in vitro*: implications for trophoblast implantation *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(5):1241-8.

Fisher L. Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. New York: Oxford University Press Inc; 1999. p. 356-68.

Fisher LW, Termine JD, DeJter SW Jr, Whitson SW, Yanagishita M, Kimura JH, Hascall JR, Kleinman HK, Hassell JR, Nilsson B. Proteoglycans of developing bone. *J Biol Chem*. 1983;258(10):6588-94.

Fisher LW, Termine JD. Noncollagenous protein influencing the local mechanisms of calcification. *Clin Orthop Relat Res*. 1985;200:362-85.

Fisher SJ, Cui TY, Li Z, Hartman L, Grahl K, Zhang GY, Tarpey J, Damsky CH. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells-in vitro. *J Cell Biol*. 1989;109:891-902.

Frank HG, Genbacev O, Blaschitz A, Chen CP, Clarson L, Evain-Brion D, Gardner L, Malek A, Morrish D, Loke YW, Tarrade A. Cell culture models of human trophoblast--primary culture of trophoblast--a workshop report. *Placenta*. 2000; 21 Suppl A: S120-2.

Frank HG, Malekzadeh F, Kertschanska S, Crescimanno C, Castellucci M, Lang I, Desoye G, Kaufmann P. Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Acta Anat (Basel)*. 1994;150:55-68.

Frank HG, Morrish DW, Potgens A, Genbacev O, Kumpel B, Caniggia I. Cell culture models of human trophoblast: Primary culture of trophoblast - A workshop report. *Placenta*. 2001;22:Suppl A: S107-9.

Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5197-203.

Friedl P, Bröcker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57:41-64.

Gagnon R. Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;110 Suppl 1:S99-107.

Götte M, Sofeu Feugaing DD, Kresse H. Biglycan is internalized via a chlorpromazine-sensitive route. *Cell Mol Biol Lett*. 2004;9:475-81.

Groth S, Schulze M, Kalthoff H, Fändrich F, Ungefroren H. Adhesion and Rac1-dependent regulation of biglycan gene expression. By transforming growth factor-beta. Evidence for oxidative signaling through NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2005;280(39):33190-9.

Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2002;168(12):5989-92.

Harris LK, Jones CJP, Aplin JD. Adhesion Molecules in Human Trophoblast - A Review. II. Extravillous Trophoblast. Placenta. 2009;30:299-304.

Hascall VC, Kimura JH. Proteoglycans: isolation and characterization. *Methods Enzymol*. 1982; 82A:769-800.

Hausser H, Ober B, Quentin-Hoffmann E, Schmidt B, Kresse H. Endocytosis of different members of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan family. *J Biol Chem*. 1992;267(16):11559-64.

Hayashi Y, Liu CY, Jester JJ, Hayashi M, Wang IJ, Funderburgh JL, Saika S, Roughley PJ, Kao CW, Kao WW. Excess biglycan causes eyelid malformation by perturbing muscle development and TGF-alpha signaling. *Dev Biol*. 2005;277(1):222-34.

Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*. 1994;302:527-34.

Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol*. 1998;17(1):1-19.

Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekstrom ES, Scheynius A. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology*. 2002;107:145-51.

Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res.* 1998d;291:133-48.

Huppertz B, Kertschanska S, Frank HG, Gaus G, Funayama H, Kaufmann P. Extracellular matrix components of the placental extravillous trophoblast: immunocytochemistry and ultrastructural distribution. *Histochem Cell Biol.* 1996;106: 291-301.

Iacob S, Cs-Szabo G. Biglycan regulates the expression of EGF receptors through EGF signaling pathways in human articular chondrocytes. *Connect Tissue Res.* 2010;51:347-58.

Inkson CA, Ono M, Bi Y, Kuznetsov SA, Fisher LW, Young MF. The potential functional interaction of biglycan and WISP-1 in controlling differentiation and proliferation of osteogenic cells. *Cells Tissues Organs.* 2009;189:153-7.

Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(8):4489-92.

Iozzo RV, Murdoch AV. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 1996;10:598-614.

Iozzo RV. Proteoglycans: structure, function and role in neoplasia. *Lab Invest.* 1985;53:373-96.

Iwanaga S. Ultrastructural observations on human endometrial stromal cells during the normal menstrual cycle-with special reference to so-called "predecidual cells". *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 1983;35:177-82.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 2010;327(5963):291-5.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5(10):987-95.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 2006;127(1):125-37.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.

Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov

R, Noble PW. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*. 2005;11(11):1173-9.

Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2002;168(10):5233-9.

Johnstone B, Markopoulos M, Neame P, Caterson B. Identification and characterization of glycanated and non-glycanated forms of biglycan and decorin in the human intervertebral disc. *Biochem J*. 1993;292(Pt3):661-6.

Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Nagamatsu S, Nakamura Y, Lotfi A, Kawakami H, Iwashita M. Alphavbeta3 integrin signaling pathway is involved in insulin-like growth factor I-stimulated human extravillous trophoblast cell migration. *Endocrinology*. 2003;144:1620-30.

Kamo I, Kikuchi A, Nonaka I, Yamada E, Kondo J. Haemopoietic activity associated with biglycan like proteoglycan. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;195(2):1119-26.

Kämmerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz H, Kämpgen R, Dietl J. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am J Pathol*. 2000;157(1):159-69.

Kappler J, Junghans U, Koops A, Stichel CC, Hausser HJ, Kresse H, Müller HW. Chondroitin/dermatan sulphate promotes the survival of neurons from rat embryonic neocortex. *Eur J Neurosci*. 1997;9(2):306-18.

Kaufmann P, Castelucci M. Extravillous trophoblast in the human placenta. A review. *Trophoblast Res*. 1997;10:21-65.

Kaufmann P. Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. *Contrib Gynecol Obstet*. 1985;13:5-17.

Kayisli UA, Korgun ET, Akkoyunlu G, Arici A, Demir R. Expression of integrin alpha5 and integrin beta4 and their extracellular ligands fibronectin and laminin in human decidua during early pregnancy and its sex steroid-mediated regulation. *Acta Histochem*. 2005;107(3):173-85.

Kemp B, Kertschanska S, Kadyrov M, Rath W, Kaufmann P, Huppertz B. Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochem Cell Biol*. 2002;117:401-14.

Khaliq A, Li XF, Shams M, Sisi P, Acevedo CA, Whittle MJ, Weich H, Ahmed A. Localisation of placenta growth factor (P1GF) in human term placenta. *Growth Factors*. 1996;13:243-50.

Kikuchi A, Iwakami N, Takahashi K, Suzuki J, Kondo J, Yamada E, Nonaka I,

Kamo I. Immunological and biochemical characterization of biglycan-like haemopoietic factor. *Immunology*. 1995;85(1):131-9.

Kikuchi A, Tomoyasu H, Kido I, Takahashi K, Tanaka A, Nonaka I, Iwakami N, Kamo I. Haemopoietic biglycan produced by brain cells stimulates growth of microglial cells. *J Neuroimmunol*. 2000;106(1-2):78-86.

Kikuchi A, Tomoyasu H, Kamo I. IL-2 and proteoglycans synergistically induce antigen-specific B-cell responses – a possible immune response in the hyperplastic myasthenia thymus. *J Neuroimmunol*. 2008;205(1-2):37-43.

Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 2009;457(7225):102-6.

Kinsella MG, Tsoi CK, Jarvelainen HT, Wight, TN. Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. The role of endogenous basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. 1997;272:318-25.

Kisalus LL, Herr JC. Immunocytochemical localization of heparan sulphate proteoglycan in human decidual cell secretory bodies and placental fibrinoid. *Biol. Reprod*. 1988;39:419-30.

Kiss E, Popovic ZV, Bedke J, Adams J, Bonrouhi M, Babelova A, Schmidt C, Edenhofer F, Zschiedrich I, Domhan S, Abdollahi A, Schäfer L, Gretz N, Porubsky S, Gröne HJ. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma can inhibit chronic renal allograft damage. *Am J Pathol*. 2010;176(5):2150-62

Klaffenbach D, Rascher W, Röllinghoff M, Dötsch J, Meissner U, Schnare M. Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human choriocarcinoma cell lines. *Am J Reprod Immunol*. 2005;53(2):77-84.

Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, Klein-Nulend J. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;342(3):902-8.

Knöfler M, Pollheimer J. IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion. *Placenta*. 2012;33 Suppl:S55-62.

Knöfler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol*. 2010;54:269-280.

Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):587-600.

Korhonen M, Virtanen I. The distribution of laminins and fibronectins is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. *J Histochem Cytochem*. 1997;45:569-81.

Kosanke G, Kadyrov M, Korr H, Kaufmann P. Maternal anemia results in increased proliferation in human placental villi. *Trophoblast Res.* 1998;11:339-57.

Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, Demars R. A class-I antigen, hla-g, expressed in human trophoblasts. *Science.* 1990;248:220-3.

Larsen K, Tufvesson E, Malmström J, Mörgelin M, Wildt M, Andersson A, Lindström A, Malmström A, Löfdahl CG, Marko-Varga G, Bjerner L, Westergren-Thornsson G. Presence of activated mobile fibroblasts in bronchoalveolar lavage from patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(10):1049-56.

Laskarin G, Kämmerer U, Rukavina D, Thomson AW, Fernandez N, Blois SM. Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. *Am J Reprod Immunol.* 2007;58(3):255-67.

Lawn AM, Wilson EW, Finn CA. The ultrastructure of human decidual and predecidual cells. *J. Reprod. Fertil.* 1971;26:85-90.

Le Bouteiller P, Blaschitz A. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev.* 1999;167:233-44.

Lee SA, Kim SM, Son YH, Lee CW, Chung SW, Eo SK, Rhim BY, Kim K. Peptidoglycan enhances secretion of monocyte chemoattractants via multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;408(1):132-8.

Leitner K, Szlauer R, Ellinger I, Ellinger A, Zimmer KP, Fuchs R. Placental alkaline phosphatase expression at the apical and basal plasma membrane in term villous trophoblasts. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:1155-64.

Liu J, Fitzli D, Liu M, Tseu I, Caniggia I, Rotin D, Post M. PDGF-induced glycosaminoglycan synthesis is mediated via phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol.* 1994a;274(5):L702-13.

Liu J, Laue TM, Choi HU, Tang LH, Rosenberg L. The self-association of biglycan from bovine articular cartilage. *Am J Physiol.* 1994b;269(45):28366-73.

Loke YW, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. *Hum Reprod.* 1995; 10: Suppl 2:4-21.

Loke YW, King A. Human implantation – Cell biology and immunology. Cambridge: University Press; 1995.

Loregger T, Pollheimer J, Knöfler M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast-a review. *Placenta.* 2003;24 Suppl A:S104-10.

Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:419-41.

Marzusch K, Dietl J. Immunologische aspekte im rahmen der regelrechten und gestörten Schwangerschaft beim Menschen. Tübingen: Universitäts-Frauenklinik Tübingen, 1994.

Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296(5566):301-5.

McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, Demars R, Kovats S, Damsky C, Fisher SJ. Human placental hla-g expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol*. 1995;154:3771-8.

Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T, Tsukihara S, Iwabe T, Harada T, Terakawa N. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J Reprod Immunol*. 2006. 72(1-2):46-59.

Miyazaki T, Miyauchi S, Tawada A, Anada T, Matsuzaka S, Suzuki O. Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*. 2008;217:769-77.

Mochida Y, Parisuthiathan D, Yamaguchi M. Biglycan is a positive modulator of BMP-2 induced osteoblast differentiation. *Adv Exp Med Biol*. 2006;585:101-13.

Mor G, Abrahams VM. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:119.

Moreth K, Brodbeck R, Babelova A, Gretz N, Spieker T, Zeng-Brouwers J, Pfeilschifter J, Toung MF, Schaefer RM, Schaefer L. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4251-72.

Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest*. 1998;101:406-12.

Muhlhauser J, Crescimanno C, Kasper M, Zaccheo D, Castellucci M. Differentiation of human trophoblast populations involves alterations in cytokeratin patterns. *J Histochem Cytochem* 1995;43:579-89.

Muir H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. *Biochem Soc Trans*. 1983;11(6):613-22.

Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL, Potential

regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*. 2002;297(5588):1867-70.

Murthi P, Faisal FA, Rajaraman G, Stevenson J, Ignjatovic V, Monagle PT, Brennecke SP, Said JM. Placental biglycan expression is decreased in human idiopathic fetal growth restriction. *Placenta*. 2010;31:712-7.

O'Neil LA. Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal? *Trends Immunol*. 2002;23:296-300.

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276(13):10229-33.

Oksenberg JR, Mor-Yosef S, Persitz E, Schenker Y, Mozes E, Brautbar C. Antigen-presenting cells in human decidual tissue. *Am J Reprod Immunol Microbiol*. 1986;11(3):82-8.

Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(4):359-65.

Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, Lubzens E, Huppertz B. Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta*. 2011;32 Suppl:S49-54.

Oritani K, Kincade PW. Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J Cell Biol*. 1996;134:771-82.

Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Dixon G, Brosens I. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta*. 1981;2:303-16.

Pollheimer J, Haslinger P, Fock V, Prast J, Saleh L, Biadasiewicz K, Jetne-Edelmann R, Haraldsen G, Haider S, Hirtenlehner-Ferber K, Knöfler M. Endostatin Suppresses IGF-II-Mediated Signaling and Invasion of Human Extravillous Trophoblasts. *Endocrinology*. 2011;152(11):4431-42.

Pollheimer J, Knöfler M. Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta*. 2005;26 Suppl A:S21-30.

Popovic ZV, Wang S, Papatriantafyllou M, Kaya Z, Porubsky S, Meisner M, Bonrouhi M, Burgdorf S, Young MF, Schaefer L, Gröne HJ. The proteoglycan biglycan enhances antigen-specific T cell activation potentially via MyD88 and TRIF pathways and triggers autoimmune perimyocarditis. *J Immunol*. 2011;187(12):6217-26.

Potgens AJG, Gaus G, Frank HG, Kaufmann P. Characterization of trophoblast cell isolations by a modified flow cytometry assay. *Placenta*. 2001;22:251-5.

Prast J, Saleh L, Husslein H, Sonderegger S, Helmer H, Knöfler M. Human

chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology*. 2008;149:979-87.

Qiu Q, Basak A, Mbikay M, Tsang BK, Gruslin A. Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11047-52.

Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction*. 2004;128:355-63.

Quenby S, Mountfield S, Cartwright JE, Whitley GS, Chamley L, Vince G. Antiphospholipid antibodies prevent extravillous trophoblast differentiation. *Fertil Steril*. 2005;83:691-8.

Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37(6):478-84.

Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004;114:744-54.

Reimann T, Büscher D, Hipskind RA, Krautwald S, Lohmann-Matthes ML, Baccarini M. Lipopolysaccharide induces activation of the Raf1/MAP kinase pathway. A putative role for Raf1 in the induction of IL-1 beta and the TNF-alpha genes. *J Immunol*. 1994;153(12):5740-9.

Reinboth B, Hanssen E, Cleary EG, Gibson MA. Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J Biol Chem*. 2002 8;277(6):3950-7.

Rosenberg LC, Choi HU, Tang LH, Johnson TL, Pal S, Webber C, Reiner A, Poole AR. Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J Biol Chem*. 1985;260(10):6304-13.

Roughley PJ, White RJ, Magny MC, Liu J, Pearce RH, Mort JS. Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage. 1993; 295(Pt2):421-6.

Ruggeri A, Benazzo F. Collagen proteoglycan interaction. In: Ruggeri A, Motta PM, editors. *Ultrastructure of connective tissue matrix*. Boston: Nijhoff Publ. 1984; p.113-25.

Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991;64:867-9.

Saber T, Veale DJ, Balogh E, McCormick J, NicAnUltaigh S, Connolly M, Fearon U. Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2011;6:e23540.

Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases – A review. *Placenta*. 2003;17:S76-S85.

San Martin S, Soto-Suazo M, De Oliveira SF, Aplin JD, Abrahamsohn P, Zorn TM. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. *Reproduction*. 2003;125:585-95.

San Martin S, Zorn TM. The small proteoglycan biglycan is associated with thick collagen fibrils in the mouse decidua. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003;49:673-8.

Sanches JC, Jones CJ, Aplin JD, Iozzo RV, Zorn TM, Oliveira SF. Collagen fibril organization in the pregnant endometrium of decorin-deficient mice. *J Anat*. 2010;216(1):144-55.

Santiago-García J, Kodama T, Pitas RE. The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 2003;278(9):6942-6.

Santos-Sierra S, Deshmukh SD, Kalnitski J, Kuenzi P, Wymann MP, Golenbock DT, Henneke P. Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization. *EMBO J*. 2009;28:2018-27.

Schaefer L, Beck KF, Raslik I, Walpen S, Mihalik D, Micegova M, Macakova K, Schonherr E, Seidler DG, Varga G, Schaefer RM, Kresse H, Pfeilschifter J. Biglycan, a nitric oxide-regulated gene, affects adhesion, growth, and survival of mesangial cells. *J Biol Chem*. 2003;278(28):26227-37.

Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Götte M, Malle E, Schaefer RM, Gröne HJ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*. 2005;115:2223-33.

Schaefer L, Iozzo RV. Biological Functions of the Small Leucine-Rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. *J Biol Chem*. 2008;283(31):21305-9.

Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010;339:237-46.

Shimada S, Nishida R, Takeda M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H, Yamada H. Natural killer, natural killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2006;56(3):193-200.

Schuppan D, Rühl M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27(9):2125-41.

Sciandra F, Morlacchi S, Allamand V, De Benedetti G, Macchia G, Petrucci TC, Bozzi M, Brancaccio A. First molecular characterization and immunolocalization of keratopithelin in adult human skeletal muscle. *Matrix Biol.* 2008;27(4):360-70.

Scott JE. The nomenclature of glycosaminoglycans and proteoglycans. *Glycoconj J.* 1993;10(6):419-21.

Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Kuroda M, Kobayashi E, Hayashi M, Saruta T. Extracellular matrix glycoprotein biglycan enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res.* 2004;94:1067-1074.

Shorter SC, Jackson MC, Sargent IL, Redman CWG, Starkey PM. Purification of human cytotrophoblast from term amniochorion by flow-cytometry. *Placenta.* 1990;11:505-13.

Shorter SC, Starkey PM, Ferry BL, Clover LM, Sargent IL, Redman CWG. Antigenic heterogeneity of human cytotrophoblast and evidence for the transient expression of mhc class-i antigens distinct from HLA-G. *Placenta* 1993;14:571-82.

Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2001;167(5):2887-94.

Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL. Evident for immune cell involvement in spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *The American Journal of Pathology.* 2009;174(5):1961-71.

Sonderegger S, Haslinger P, Sabri A, Leisser C, Otten JV, Fiala C, Knöfler M. Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation. *Endocrinology.* 2010;151:211-20.

Stark J, Kaufmann P. Die basalplatte der reifen menschlichen placenta. III – Bindegewebs und deciduazellen. *Arch Gynäcol.* 1973;213:185-201.

Stenqvist A, Chen T, Hedlund M, Dimova T, Nagaeva O, Kjellberg L, Innala E, Mincheva-Nilsson L. An efficient optimized method for isolation of villous trophoblast cells from human early pregnancy placenta suitable for functional and molecular studies. *Am J Reprod Immunol.* 2008;60:33-42.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1-14.

Takeda K, Akira S. Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn J Infect Dis.* 2001;54(6):209-19.

Tarrade A, Lai Kuen R, Malassine A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest.* 2001;81:1199-211.

Tomoyasu H, Kikuchi A, Kamo I. Identification of haemopoietic biglycan in hyperplastic thymus associated with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 1998;89(1-2):59-63.

Torpin R. Placentation in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Obstet Gynecol.* 1969;34:410-3.

Tufvesson E, Malmstrom J, Marko-Varga G, Westergren-Thorsson G. Biglycan isoforms with differences in polysaccharide substitution and core protein in human lung fibroblasts. *Eur J Biochem.* 2002;269:3688-96.

Tufvesson E, Westergren-Thorsson G. Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem.* 2000;77(2):298-309.

Tufvesson E, Westergren-Thorsson G. Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signaling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. *J Cell Science.* 2003;116:4857-63.

Tufvesson E, Westergren-Thorsson G. Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin. *FEBS Lett.* 2002;530:124-8.

van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis.* 2008;11(1):91-9.

von Rango U, Krusche CA, Kertschanska S, Alfer J, Kaufmann P, Beier HM. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. *Placenta.* 2003;24:929-40.

Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmaki E. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod.* 1997;56:489-94.

Wang X, Harimoto K, Xie S, Cheng H, Liu J, Wang Z. Matrix protein biglycan induces osteoblast differentiation through extracellular signal-regulated kinase and Smad pathways. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(11):1891-7.

Wang Y, Deng Y. Signaling of biglycan and cytokines in bovine intervertebral disc cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2011;36(9):889-94.

Ward M, Ajuwon KM. Regulation of pre-adipocyte proliferation and apoptosis by the small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin. *Cell Prolif.* 2011;44:343-51.

Wiberg C, Heinegård D, Wenglén C, Timpl R, Mörgelin M. Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:49120-6.

Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, Paulsson M, Bateman JF, Heinegård D, Mörgelin M. Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37698-704.

Wight TN. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*. 1989;9(1):1-20.

Winterhager E, Kaufmann P, Gruemmer R. Cell-cell-communication during placental development and possible implications for trophoblast proliferation and differentiation. *Placenta*. 2000;21:Suppl A:S61-8.

Winterhager E, von Ostau C, Grümmer R, Kaufmann P, Fisher SJ. Connexin und E-cadherin expression während der differenzierung des humanen trophoblasten. Jena: 91 Versammlung der Anat Gesellschaft; 1996.

Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF, Chadban SJ. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2007;117(10):2847-59.

Wynn RM. Electron microscopy of the developing decidua. *Fertil. Steril*. 1965;16:16-26.

Xu G, Chakraborty C, Lala PK. Reconstitution of smad3 restores TGF-beta response of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 upregulation in human choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;383-90.

Yagel S, Kerbel R, Lala P, Eldar-Gera T, Dennis JW. Basement membrane invasion by first trimester human trophoblast: requirement for branched complex-type Asn-linked oligosaccharides. *Clinical and Experimental Metastasis*. 1990;8:305-17.

Zhou GL, Tucker DF, Bae SS, Bhatheja K, Birnbaum MJ, Field J. Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *J Biol Chem*. 2006;281(47):36443-53.

Zhou H. Proteomic analysis of hydroxyapatite interaction proteins in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:323-6.

Zybina TG, Frank HG, Biesterfeld S, Kaufmann P. Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of differentiation and invasion into endometrium and myometrium. II. Mechanisms of polyploidization. *Tsitologiia*. 2004;46:640-8.

Zybina TG, Kaufmann P, Frank HG, Freed J, Kadyrov M, Biesterfeld S. Genome multiplication of extravillous trophoblast cells in human placenta in the course of

differentiation and invasion into endometrium and myometrium. I. Dynamics of polyploidization. Tsitologiya. 2002;44:1058-67.

APÊNDICE – Artigo submetido

Term basal plate as a source of functional extravillous trophoblast cells

AU Borbely^{*1}, S Sandri^{*2}, IR Fernandes³, KM Prado¹, S Correa-Silva¹, R Albuquerque², M Knöfler⁴, P Beltrão-Braga^{3,5}, A Campa², E Bevilacqua¹

¹Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 05508-000, Brazil. ²Department of Clinical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 05508-000, Brazil. ³Department of Surgery, Veterinary Medicine and Zootechnology School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 05508-000, Brazil. ⁴Department of Obstetrics and Fetal-Maternal Medicine, Reproductive Biology Unit, Medical University of Vienna, Vienna, 1090, Austria. ⁵School of Arts, Sciences and Humanities, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 03828-000, Brazil.

Running Title: Term basal plate as a source of EVT cells

* Authors contributed equally.

✉ **Corresponding author:**

Estela Bevilacqua, Ph.D.

Department of Cell and Developmental Biology

Institute of Biomedical Sciences

University of Sao Paulo

1524, Prof. Lineu Prestes, Ave – 05508-900, São Paulo – SP, Brazil

Telefax: ++55-11-3091-7307

Email: bevilacq@usp.br

ABSTRACT

Background: Extravillous trophoblast (EVT) cells are essential for placental growth and correct attachment and are needed for healthy gestation. In this study, we report the isolation of fully differentiated EVT cells from the basal plate of term placenta.

Methods: Basal plate was carefully dissected from the villous tissue and from the amniochorion membrane and submitted enzymatic digestion. The term basal EVT cells were isolated using a gradient of 30 and 60 % Percoll. The isolated cells were characterized and their intrinsic characteristics and invasive potential were evaluated.

Results: Immunolocalization showed that the isolated cells were positive for cytokeratin-7 (CK-7), placental growth factor, placental alkaline phosphatase, human leukocyte antigen G, and $\alpha 1$ and $\alpha 5$ integrins. Around 95% of the isolated cells labeled positively for CK-7. When EVT from first trimester placental villi were compared with those from term basal plate, the main EVT markers were remarkably similar. The term EVT cells remained viable during 48 h of culture as indicated by propidium iodide incorporation and Trypan blue exclusion. RT-PCR for housekeeping and metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 genes indicated that mRNA expression was also preserved up to 48 h of culturing. The capacity for invasiveness was evaluated by a transwell insert invasion assay. EVT cells maintained on Matrigel and fibronectin-coated inserts became less invasive in the presence of transforming growth factor-beta and more invasive with epidermal growth factor. The gelatinolytic activities of MMP-2 and -9 were correlated with the invasion rate.

Conclusions: In summary, term basal plate is a viable source of functional EVT cells and an alternative to villous explant-derived EVT cells and cell lines. Our findings also show that isolated term EVT cells are potentially useful for invasion studies in

healthy gestations and probably also gestational pathologies in which invasiveness is changed.

Keywords:

Basal plate/ cell isolation/ extravillous trophoblast cells/ invasion/ term placenta

BACKGROUND

The trophoblast is a specific placental cell type capable of yielding functionally different subpopulations of cells. Villous cytotrophoblast cells (VCT), located inside

the chorionic villi, differentiate either to form the syncytiotrophoblast (ST) or to proliferate outside the villi anchoring to the basal plate, yielding a heterogeneous population of cells, the extravillous cytotrophoblast (EVT) [1]. EVT comprises subpopulations of cells with different morphologies and functions that are found in different placental regions [2]. In first-trimester placenta, these cells are abundant and exhibit increased invasive behavior, although accurately regulated and spatially confined to the endometrium, myometrium and spiral arteries [3]. The genetic and biological events involved in trophoblast invasion have been compared to those adopted by neoplastic cells [4]. There is a high incidence of invasiveness-related changes in trophoblasts in adverse pregnancy outcomes such as placenta accreta [5], pre-eclampsia [6], and other gestational trophoblastic diseases [7]. Thus, new models are needed for studying the mechanisms involved in normal and pathological trophoblast invasion and for identifying potential therapeutic targets.

Villous tissue, villous explant outgrowth, and amniochorion membrane are useful sources from which trophoblast cells can be isolated [8-18]. Explant cultures of anchoring villi and VCT/EVT cells isolated from villous tissue obtained from first-trimester placentas have also been used successfully to yield migratory, temporarily proliferative cytotrophoblast cells for differentiation and invasion studies [8, 11]. The contribution of these procedures to elucidating the physiology and paracrine regulation of trophoblast cells has been inestimable [19-22]. Third-trimester explants and villous digestion to yield VCT cells have also been used [14, 15], although these seem to produce less viable and invasive VCT/EVT cells than first-trimester explants. The terminally differentiated nature of third-trimester VCT cells *in vivo* has also been considered an experimental obstacle [10, 23]. Term EVT cells can also be isolated in large quantities from the amniochorion membrane [14, 16]. These cells tend to merge

in vitro, resulting in giant polyploid multinucleated trophoblast cells [16], which are phenotypically and functionally different from *in vivo* EVT cells in respect of invasive behavior. The transformation of mononuclear EVT cells into giant multinucleated trophoblast cells and polyploidization seem to be mechanisms associated with reduced invasiveness [24]. In addition, EVTs from decidual basal plate are in direct contact to maternal cells, which may be important for a better understanding of the invasive and tolerance process promoted by these cells.

Thus, herein, we have investigated whether the basal plate from term placenta could be a viable source of fully differentiated EVT cells, able to be used as a model for studying trophoblast physiology, which includes relationship with decidual cells and invasion. Also, since first trimester placenta might not be available due to ethical considerations, term basal plate EVT might represent a valuable alternative source.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Collagenase type II, insulin, calcium lactate, sodium pyruvate, nucleosides, and Trypan blue (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Antibiotics, 4',6'-diamino-2-phenylindole dihydrochloride- (DAPI), deoxynuclease (DNase) type I, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), fibronectin, Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Tryzol® reagent, SuperScript® First Strand kit, and Taq Polymerase (Invitrogen Carlsbad, USA). Matrigel, transwell inserts and filters (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). All other reagents used were from Merck, Darmstadt, Germany) unless otherwise indicated. The specificities and sources of the antibodies used in this study are listed in Table I.

Tissue collection

Twenty term placentas (36–40 weeks) were obtained from women having elective Caesarean section with healthy babies and no pregnancy complications. Ethical committee approvals for this study were granted by the University Hospital and the Institute of Biomedical Sciences from University of Sao Paulo, and informed consent was obtained before surgery. Pools of first trimester placentas (6-12 weeks) were obtained from legal abortions of uncomplicated pregnancies. The use of these tissues was approved by the ethical committee of the Medical University of Vienna.

Isolation of EVT cells

The term basal plate is a membrane about 3-6 mm thick, which was carefully dissected from the villous tissue and from the amniochorion membrane. The isolation of EVT cells was based on a method previously described, with some changes (Shorter *et al.*, 1990). Briefly, the fragments were coarsely minced and approximately 5 g of wet tissue were incubated for 1 h with 20 mL of DMEM/F12 containing 4 % bovine serum albumin (BSA), collagenase type II (1 mg/mL), and DNase type I (25 U/mL), at 37° C in a water bath, followed by addition of 20 % FBS. Cell suspension was double-filtered, first through a 100 µm mesh and secondly through a 70 µm mesh; centrifuged at 400 × g, and cells were washed and resuspended in complete DMEM/F12 (supplemented with 1 % antibiotics, 10 % FBS, 0.01 % insulin, 520 µg/mL calcium lactate, 56 µg/mL sodium pyruvate and 1 % nucleosides). EVT cells were isolated using a gradient of 30 and 60 % Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) followed by centrifugation at 700 × g for 30 min as described previously [25]. The band between 30 % and 60 % Percoll was collected. When needed, the cell

suspension was incubated with 0.83 % ammonium chloride in PBS and centrifuged at $400 \times g$ for 5 min. First trimester EVT were isolated from pooled first trimester villous tissue, as described previously, using adapted enzymatic dispersion and Percoll density gradient centrifugation (Ge Healthcare) [26].

Cell culture

The isolated cells were plated on culture dish plates (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) coated with Matrigel (1:1 in DMEM/F12) or fibronectin (10 $\mu\text{g/mL}$ in PBS). Plated cells were incubated for 12 h at 37 °C under a humidified atmosphere of 5 % CO_2 in air to achieve attachment. Non-adherent cells were washed out, and complete DMEM/F12 or IMDM supplemented with 10 % FBS were added.

Immunofluorescence

Isolated cells (3×10^5 cells/well) were plated, and after 48 h they were fixed in ice-cold methanol. For blocking, 1 % BSA in PBS was used and cells were incubated with primary antibody followed by incubation with fluorescent secondary antibody or incubated with Zenon® Tricolor mouse IgG labeling kit (Table I). Nuclei were stained with 0.2 μM DAPI. The coverslips were mounted with 1:9 (v/v) PBS/glycerol. Fluorescent cells were quantified as the percentage of reactive cells in the total number of stained nuclei per microscopic field, in a total of four fields per sample. Negative controls were developed by adding non-related antibodies.

Flow cytometry

For cell viability assays, cells (3×10^5 cells/well) were labeled with 2 $\mu\text{g/mL}$ PI and

analyzed using FACSCanto® flow cytometric equipment (Becton Dickinson). For intracellular labeling, cells (3×10^5 cells/well) were incubated in 5 % normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA), washed, fixed and permeabilized using commercial buffers (e-Bioscience, San Diego, USA) according to the supplier's instructions. The cells were then incubated in permeabilization buffer with target antibody previously conjugated with a Zenon® Tricolor mouse IgG labeling kit. Finally, they were resuspended in 0.1 % BSA in PBS and analyzed. The data were analyzed using FlowJo® software (Tree Star Inc., Ashland, USA).

Trypan blue dye exclusion test

Isolated cells (2.5×10^4 cells/well) were mixed with 0.4 % Trypan blue dye in the ratio 1:1 (v/v), and the numbers of viable and dead cells were counted using a hemocytometer.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted (3×10^5 cells/well) using Tryzol® according to the supplier's instructions. The RNA was assessed by ultraviolet spectrophotometry using a ND-100 spectrophotometer (Nano Drop Technologies, Rockland, USA), and the cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using a SuperScript® First Strand kit. RT-PCR was performed using Taq polymerase. The primer sequences, annealing temperatures, and PCR product sizes are shown in Table II. The PCR

products were visualized with ethidium bromide after electrophoresis on 1% agarose gel.

Invasion assays

The invasion assays were conducted in transwell inserts using 24-well fitted inserts with 8 μm pore size. The inserts were pre-coated with 15 μL of Matrigel (1:1 v/v in DMEM/F12) or 30 μL of fibronectin (10 $\mu\text{g/mL}$ in PBS). Cells (5.6×10^4 cells/well) were resuspended in complete DMEM/F12, treated with 10 ng/mL TGF- β or 50 ng/mL EGF, and seeded. Lower chambers were loaded with complete DMEM/F12. After 48 h, non-invading cells were removed, and membranes were fixed and stained with 0.2 % violet crystal dye. In parallel, both lower and supernatants were harvested to evaluate the effects of EGF/TGF on EVT cells proliferation.

DNA Incorporation by BrDUr

Cells plated at the concentration of 3×10^5 cells/well and cultured for 24 and 48 h were used to assess proliferation rates. Cultured cells were incubated with 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 5-bromo-2'-deoxyuridine (Merck, Darmstadt, Germany) in DMEM/F12 complete medium for 3 h before fixation in 4 % paraformaldehyde in PBS for 20min at room temperature. The detection of BrDU and, therefore, cells incorporating DNA for proliferation was performed according to the manufacture's instruction, using a mouse IgG antibody against BrDU.

Gelatin Zymography

The presence of matrix metalloproteinases (MMPs) in the culture supernatants was demonstrated by gelatin zymography. The harvested media were standardized according to the protein contents of the cell lysates. Thirty μg of total protein were

separated on 10 % SDS-PAGE gels containing 5 mg/mL gelatin. The gels were washed in 2.5 % Triton X-100 at 37 °C and incubated overnight at 37 °C in reaction buffer (0.05 M Tris-HCl, pH = 8.5, 10 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂). They were stained with Coomassie solution (0.5 % Coomassie brilliant blue R-250 in 10 % methanol and 10 % acetic acid) and destained in 10 % methanol and 10 % acetic acid. Clear zones of gelatin lysis against the blue background stain indicated the presence of MMPs.

Photographic documentation

An Axiovert S100 inverted light microscope (Zeiss, Jena, Germany) was used for general cell morphology and cell counting. Immunofluorescence was analyzed using an Axioskop 2 fluorescence microscope (Zeiss) and the images were captured using the program AxioVision 4.7 (Zeiss).

Statistical analysis

Statistical analyses were based on one-way analysis of variance followed by a Student-Newman-Keuls multiple comparisons test using Prism v5.0 software from GraphPad (San Diego, CA, USA).

RESULTS

Characterization and purity of term basal plate EVT

The yield of isolated cells from the basal plate of term placenta was in the range of $2\text{--}6 \times 10^6$ cells/20 g tissue. After isolation, cells exhibited a homogenous, small and roundish morphology with large nuclei and prominent nucleoli (Figure 1A). The isolated cells were not multinucleated or giant cells. In addition, they were found as

columns (Figure 1B-C) and most of them showed enlarged cytoplasm and cell protrusions (Figure 1D-F), suggesting a migratory phenotype.

EVT cells were characterized for cytokeratin-7 (CK-7) and vimentin (Vm), known markers of epithelial and mesenchymal cells, respectively. The isolated cells were positive for CK-7 and negative for Vm (Figure 2B-C). Most of the isolated cells were positive for placental growth factor (PIGF) and placental alkaline phosphatase (PIAP) (Figure 2E-F). On average, 95 % of them were positive for CK-7 as evaluated by flow cytometry (Figure 2H), corroborating the morphological and immunofluorescence findings.

EVT cells present a unique repertoire of adhesion molecules closely related to the invasive process and special antigens from the histocompatibility complex. Therefore, the identity of the 48 h-cultured term EVT population was also assessed by immunofluorescence and compared with those from first trimester EVT for human leukocyte antigen G1 (HLA-G1) (Figure 3B-C), $\alpha 1$ integrin (Figure 3E-F) and $\alpha 5$ integrin (Figure 3H-I). The percentages of EVT cell markers were quite similar, as summarized in Table III.

Term basal plate EVT's are viable and preserve mRNA expression

The effect of isolation and culturing on EVT viability after isolation was 80 % by PI incorporation and 70 % by Trypan blue exclusion (Figure 4 A-B). Cell viability values were similar after 24 and 48 h of culture and for the two different culture media examined: complete DMEM/F12 (Figure 4A) and IMDM (Figure 4B). The proliferation was also assessed by BrDU assay. As expected for terminal differentiated EVT cells, they did not proliferate (data not shown). mRNA expression

of term EVT cell was preserved when cultured, as assessed through GAPDH and 18S housekeeping genes (Figure 4C).

Metalloproteinase expression and activity

In view of their pivotal role in cell invasion, gene expression of MMP-2 and MMP-9 was assessed (Figure 4C). MMP-2 mRNA was expressed at all time points. In contrast, expression of MMP-9 mRNA was not detected after isolation, but it was observed at 24 h and thereafter (Figure 4C). MMP activity was also evaluated in the culture supernatants using gelatin zymography. As shown in Figure 5C, the activity of both MMPs in Matrigel increased in the presence of EGF and decreased in the presence of TGF- β in relation to control. In presence of fibronectin, the effects of EGF and TGF- β were not so evident Figure 5D.

Term basal plate EVT maintains their invasive properties

The invasion potential of EVT cells was evaluated by transwell inserts coated with Matrigel and fibronectin in the presence of TGF- β and EGF at concentrations of 10 and 50 ng/mL, respectively. Thus, TGF- β decreased invasion, while EGF lead to a significant enhancing in the EVT cells invasive activity (Figure 5A-B). It was not observed any changes in proliferation rates after TGF- β and EGF addition to the culture system (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we showed that term basal plate is a source of viable and functional EVT cells. These isolated cells from the basal plate were small and roundish after their isolation and, during culture, most of them were found in columns, presenting an

enlarged cytoplasm with cellular protrusions. Furthermore, isolated EVT cells were positive for CK-7, PIAP, PIGF, HLA-G, and $\alpha 1$ and $\alpha 5$ integrins. The expression patterns of these major markers in the term EVT cells were similar to that in first trimester EVT. The viability of these cells and mRNA expression for housekeeping and metalloproteinase genes was maintained during culture. In addition, term EVT cells responded differentially to regulatory molecules that inhibited or stimulated cell invasion and MMP-2 and MMP-9 activities.

First - and second-trimester human EVT cells constitute a prominent cell population exhibiting high migratory/invasive activities [3]. However, EVT cells are partially replaced at term by fibrinoid and are therefore less numerous. This cell population derives from the small spindle-shaped diploid cells found in the initial gestational trimester [24], exhibiting a tendency towards polygonal column formation and polyploidy and reduced invasive activity [27]. These characteristics have been considered disadvantageous for using term basal plate EVT cells. Because of this judgment, EVT cells have mostly been collected from first/second trimester villous explants and term amniochorion. However, utilization of first trimester pregnancy tissues depends on ethical considerations and legal regulations, which differ among countries. Hence, term placentas could represent an alternative and more readily available source for EVT preparations. Moreover, in spite of the different protocols that have been described [8-18], isolated and cultured EVT cells share common phenotypic characteristics.

EVT cells are the only cell type expressing cytokeratin filaments in the term basal plate, when glands and uterine epithelium are no longer present [28, 29]. Thus, the expression of CK-7 and absence of reactivity for Vm, as observed herein, indicates their trophoblastic nature. The immunolocalization of PIGF, a key placental

angiogenic factor [14, 15, 17], prevalently expressed by term cytotrophoblast cells [30, 31], indicates the same. The isolated cells were also reactive to an antibody against PIAP, a glycosylphosphatidylinositol-trophoblast anchored protein located on the apical membrane of the syncytiotrophoblast and in EVT cells found in the term placental bed, notably in the interstitial cytotrophoblast within the maternal decidua [17, 32].

Among all trophoblast markers, HLA-G1 is considered the main EVT marker and it is upregulated in first-trimester placentas [33, 34], whereas in term placenta EVT cells the ability to express HLA-G protein can be lower [35, 36]. Nevertheless, the percentage of HLA-G1-reactive cells in the term basal plate EVT was similar to that found in the first trimester EVT.

EVT cells isolated from term basal plate also seem to preserve their invasive phenotype through the expression of $\alpha 1$ and $\alpha 5$ integrins. These extracellular matrix (ECM) receptors are associated with the invasive phenotype of first trimester EVT cells, playing a pivotal role in stabilizing EVT cell columns by binding to fibronectin and by promoting invasiveness upon interaction with collagens and distinct laminins, respectively [37-40].

During the first 48h, cultured EVT cells show a plethora of characteristics indicating viable and fully active cells, although without proliferative activity. Limited proliferative capacity, commonly found in fully-differentiated cells, apparently did not interfere for the short studied periods with the biological properties of EVT cells. Prolonged EVT cell culturing, as many other differentiated cells, gradually decreases cell viability suggesting low adaptive ability to the culture conditions or the absence of specific factors from the maternal fetal interface [16].

Activation of MMPs is required for first trimester EVT invasion [23]. We also showed term basal plate EVT cells express MMP-2 and MMP-9 mRNA, and active molecules in the supernatant, suggesting MMPs may be also important for term EVT invasion. Furthermore, as well as in other EVT invasive models [20, 41], term EVT were modulated by TGF- β and EGF, in which EGF increased EVT invasion and TGF- β decreased it. These data reinforce the term basal plate EVT capacity for invasion. Although *in situ* the invasive EVT activity at term is considered downregulated/suppressed, clearly the culture conditions were able to change this phenotype. Culture conditions do not reproduce the plethora of regulatory molecules, ECM components, hormones and other factors that constitute the placental microenvironment. These data, however, emphasize the plasticity of term EVT cells in response to different stimuli and conditions, which makes them suitable for experimental studies.

Different EVT models regardless of sources are able to provide cells of quality and specificity for a number of experimental analysis. EVT cells isolated from term basal plate has the advantage of not fusing to form syncytium or multinucleated cells, as observed for the amniochorion EVT [14, 15, 27]. In addition, term basal plate EVT only adhered on ECM compounds, as fibronectin and Matrigel.

The value of EVT cells derived from first/second trimester villi for invasion studies is irrefutable; these cells develop invasive abilities *in vitro* although *in vivo* some of them very likely never will interact directly with the endometrial tissue, remaining as floating villi. Term basal plate EVT, on the other hand, beside functionally active in invasion, is fully differentiated, has already invaded maternal tissues, and has been in contact with ECM, maternal immune and non-immune cells throughout gestation. Under this perspective these cells are also excellent candidate for studies concerning

interrelationship between maternal immune, vascular and decidual systems and trophoblast.

Furthermore, although EVT cells are abundant in first-trimester placenta, it is not always possible to determine whether they are from healthy gestations. Several studies have shown that the interval between signs determining pathology and the establishment of the pathology can be of several weeks, so we cannot know whether samples from the first trimester were committed to some further gestational pathology.

Conclusions

In summary, this study describes an adapted method for isolating fully differentiated term basal plate EVT, which could provide a reliable *in vitro* model for advancing our understanding of a number of processes regulating trophoblast biology. Accordingly, term EVT cells will give support for future studies of differences between first and third trimester, but mostly important, to the comparison with third trimester pathologies, even the ones associated with EVT-invasion deficiencies. Finally, it would circumvent ethical problems regarding the use of first trimester placenta in countries where abortion is not allowed.

FUNDING

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [grant number 2009/05354-0]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [grant number 140088/2010-5]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [grant number 4178-11-4]; and the Austrian Science Funds [grant number P-22687-B13].

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rosangela Augusto de Oliveira Farias and to Katarzyna Biadasiewicz for essential assistance with *in vitro* preparations in Brazil and Austria, respectively; to Karen Steponavicius Cruz for assistance with invasion assays and flow cytometry analysis; and to Renato Massaro and professor Silvya Stuchi Maria-Engler for support with zymography assay. Also, we thank professors Sergio Ferreira de Oliveira and Ruy Gastaldoni Jaeger for donating some antibodies and for letting our group use their laboratories.

REFERENCES

1. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG: **Growth and function of the normal human placenta.** *Thromb Res* 2004, **114**:397-407.
2. Loregger T, Pollheimer J, Knofler M: **Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast - A review.** *Placenta* 2003, **24**.
3. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang ZQ, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ: **Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface.** *Science* 2003, **299**.
4. Bischof P, Meisser A, Campana A: **Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion.** *Human Fertility and Reproduction: the Oocyte, the Embryo, and the Uterus* 2001, **943**.
5. Jauniaux E, Jurkovic D: **Placenta accreta: Pathogenesis of a 20th century iatrogenic uterine disease.** *Placenta* 2012, **33**:244-251.
6. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M: **Pre-eclampsia.** *Lancet* 2005, **365**.
7. Altieri A, Franceschi S, Ferlay J, Smith J, La Vecchia C: **Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases.** *Lancet Oncology* 2003, **4**:670-678.
8. Kliman H, Nestler J, Sermasi E, Sanger J, Strauss Jr: **Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae.** *Endocrinology* 1986, **118**:1567-1582.
9. Loke YW, Burland K: **Human trophoblast cells cultured in modified medium and supported by extracellular-matrix.** *Placenta* 1988, **9**.
10. Fisher SJ, Cui TY, Li Z, Hartman L, Grahl K, Zhang GY, Tarpey J, Damsky CH: **Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells-in vitro.** *Journal of Cell Biology* 1989, **109**.
11. Tarrade A, Kuen RL, Malassine A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D: **Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta.** *Laboratory Investigation* 2001, **81**.

12. Miller R, Genbacev O, Turner M, Aplin J, Caniggia I, Huppertz B: **Human placental explants in culture: approaches and assessments.** *Placenta* 2005, **26**:439-448.
13. Kliman HJ, Feinberg RF: **Human trophoblast-extracellular matrix (ecm) interactions invitro - ecm thickness modulates morphology and proteolytic activity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, **87**.
14. Ellis SA, Sargent IL, Redman CWG, McMichael AJ: **Evidence for a novel hla-antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell-line.** *immunology* 1986, **59**.
15. Shorter SC, Jackson MC, Sargent IL, Redman CWG, Starkey PM: **purification of human cytotrophoblast from term amniochorion by flow-cytometry.** *Placenta* 1990, **11**.
16. Quenby S, Mountfield S, Cartwright JE, Whitley GS, Chamley L, Vince G: **Antiphospholipid antibodies prevent extravillous trophoblast differentiation.** *Fertility and Sterility* 2005, **83**.
17. Potgens AJG, Gaus G, Frank HG, Kaufmann P: **Characterization of trophoblast cell isolations by a modified flow cytometry assay.** *Placenta* 2001, **22**.
18. Oki N, Matsuo H, Nakago S, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Maruo T: **Effects of 3,5,3 '-triiodothyronine on the invasive potential and the expression of integrins and matrix metalloproteinases in cultured early placental extravillous trophoblasts.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004, **89**.
19. Choy MY, Manyonda IT: **The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast.** *Human Reproduction* 1998, **13**:2941-2949.
20. Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ: **Inhibition of TGF-beta(3) restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies.** *Journal of Clinical Investigation* 1999, **103**.
21. Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JWK, Lye SJ, Letarte M: **Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants.** *Endocrinology* 1997, **138**:4977-4988.
22. Wu H-X, Guo P-F, Jin L-P, Liang S-S, Li D-J: **Functional regulation of thymic stromal lymphopoietin on proliferation and invasion of trophoblasts in human first-trimester pregnancy.** *Human Reproduction* 2010, **25**.
23. von Rango U, Krusche CA, Kertschanska S, Alfer J, Kaufmann P, Beier HM: **Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester.** *Placenta* 2003, **24**.
24. Kemp B, Kertschanska S, Kadyrov M, Rath W, Kaufmann P, Huppertz B: **Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites.** *Histochemistry and Cell Biology* 2002, **117**.
25. Stenqvist A, Chen T, Hedlund M, Dimova T, Nagaeva O, Kjellberg L, Innala E, Mincheva-Nilsson L: **An efficient optimized method for isolation of villous trophoblast cells from human early pregnancy placenta suitable for functional and molecular studies.** *Am J Reprod Immunol* 2008, **60**:33-42.

26. Pollheimer J, Haslinger P, Fock V, Prast J, Saleh L, Biadasiewicz K, Jetne-Edelmann R, Haraldsen G, Haider S, Hirtenlehner-Ferber K, Knoefler M: **Endostatin Suppresses IGF-II-Mediated Signaling and Invasion of Human Extravillous Trophoblasts.** *Endocrinology* 2011, **152**.
27. Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, Lubzens E, Huppertz B: **Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia.** *Placenta* 2011, **32**.
28. Frank HG, Morrish DW, Potgens A, Genbacev O, Kumpel B, Caniggia I: **Cell culture models of human trophoblast: Primary culture of trophoblast - A workshop report.** *Placenta* 2001, **22**.
29. Muhlhauser J, Crescimanno C, Kasper M, Zaccheo D, Castellucci M: **differentiation of human trophoblast populations involves alterations in cytokeratin patterns.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1995, **43**.
30. Khaliq A, Li XF, Shams M, Sisi P, Acevedo CA, Whittle MJ, Weich H, Ahmed A: **Localisation of placenta growth factor (P1GF) in human term placenta.** *Growth Factors* 1996, **13**.
31. Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmaki E: **Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta.** *Biology of Reproduction* 1997, **56**.
32. Leitner K, Szlauer R, Ellinger I, Ellinger A, Zimmer KP, Fuchs R: **Placental alkaline phosphatase expression at the apical and basal plasma membrane in term villous trophoblasts.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2001, **49**.
33. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, Demars R: **a class-i antigen, hla-g, expressed in human trophoblasts.** *Science* 1990, **248**.
34. Le Bouteiller P, Blaschitz A: **The functionality of HLA-G is emerging.** *Immunological Reviews* 1999, **167**.
35. McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, Demars R, Kovats S, Damsky C, Fisher SJ: **Human placental hla-g expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts.** *Journal of Immunology* 1995, **154**.
36. Shorter SC, Starkey PM, Ferry BL, Clover LM, Sargent IL, Redman CWG: **Antigenic heterogeneity of human cytotrophoblast and evidence for the transient expression of mhc class-i antigens distinct from hla-g.** *Placenta* 1993, **14**.
37. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ: **Integrin switching regulates normal trophoblast invasion.** *Development* 1994, **120**.
38. Aplin JD, Haigh T, Jones CJP, Church HJ, Vicovac L: **Development of cytotrophoblast columns from explanted first-trimester human placental villi: Role of fibronectin and integrin alpha 5 beta 1.** *Biology of Reproduction* 1999, **60**.
39. Harris LK, Jones CJP, Aplin JD: **Adhesion Molecules in Human Trophoblast - A Review. II. Extravillous Trophoblast.** *Placenta* 2009, **30**.
40. Aplin JD: **expression of integrin alpha-6-beta-4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells.** *Placenta* 1993, **14**.
41. Biadasiewicz K, Sonderegger S, Haslinger P, Haider S, Saleh L, Fiala C, Pollheimer J, Knoefler M: **Transcription Factor AP-2 alpha Promotes EGF-Dependent Invasion of Human Trophoblast.** *Endocrinology* 2011, **152**:1458-1469.

Table I: List of antibodies.

Antibody	Isotype	Dilution	Source
Mouse monoclonal anti-human CK-7	IgG1	1:100	Dako Norden A/S (Glostrup, Denmark)
Mouse monoclonal anti-human HLA-G	IgG1	1:100	Exbio (Prague, Czech Republic)
Mouse monoclonal anti-human Vm	IgG2a	1:50	Dako Norden A/S (Glostrup, Denmark)
Rabbit polyclonal anti-human PIAP	IgG1	Ready to use	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Rabbit polyclonal anti-human PIGF	IgG1	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
Rabbit polyclonal anti-human α 1 integrin	IgG1	1:100	Millipore (Billerica, MA, USA)
Mouse monoclonal anti-human α 5 integrin	IgG1	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
FITC labeled rabbit anti-mouse IgG	IgG1	1:20	Dako Norden A/S (Glostrup, Denmark)
TRITC labeled goat anti-rabbit IgG	IgG1	1:50	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)
AlexaFluor 488 labeled rabbit anti-mouse IgG	IgG1	1:1000	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
AlexaFluor 568 labeled goat anti-rabbit IgG	IgG1	1:1000	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Zenon® Alexa Fluor 488 anti-mouse	IgG ₁	See supplier's instruction	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Zenon® R-phycoerythrin anti-mouse	IgG ₁	See supplier's instruction	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

TABLE II: Sequence of primers used in this study.

Gene	Sequence	Annealing (°C)	Size
18S	Forward: 5' GTAACCCGTTGAACCCCAT3'	56	115bp
	Reverse: 3' CCATCCAATCGGTAGCG 5'		
GADPH	Forward: 5' CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT3'	60	102bp
	Reverse: 3' ACCCACTCCTCCACCTTTGA5'		
MMP-2	Forward: 5' AGCTCCCGGAAAAGATTGATG3'	60	101bp
	Reverse: 3' CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT5'		
MMP-9	Forward: 5' GAGGTGGACCGGATGTTCC3'	54	106bp
	Reverse: 3' AACTCACGCGCCAGTAGAAG5'		

TABLE III: Quantitative analysis of 48 h cultured EVT-markers.

	CK-7 (%)	HLA-G (%)	α1- integrin (%)	α5- integrin (%)
Term Basal plate EVT	95 $\pm$ 3	72 $\pm$ 7	52 $\pm$ 9	53 $\pm$ 16
First trimester villous EVT	94 $\pm$ 5	71 $\pm$ 9	64 $\pm$ 3	78 $\pm$ 7

A total amount of 200 DAP-I positive cells were counted from four randomly microscopic fields on 200x magnification/slide ($n=3$ slides). At the same microscopic fields using appropriated filters, double-positivity cells for CK-7 and, HLA-G1, α 1-integrin or α 5 integrin was also counted. The values were expressed as a percentage of the total DAP-I positive cells (According to Pollheimer et al., 2011).

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: General morphology of isolated and cultured term basal plate cells. **(A)** After isolation (200x). **(B)** Cells organized in cell columns after 24 h of culture on Matrigel (200x). **(C)** Higher magnification of B (400x). **(D-F)** After 48 h of culture, cells exhibit projections indicating migratory activity (1000x). **(A)** Phase-contrast. **(B-F)** Mayer's hematoxylin staining.

Figure 2. Characterization and purity of isolated term basal plate cells cultured for 48 h. **(A, D)** Negative controls of immunostaining. **(B)** Vm staining (200x). **(C)** CK-7 staining (200x); insert shows a CK-7 positive cell exhibiting projections (1000x). **(E)** PIAP staining (400x). **(F)** PIGF staining (200x). **(G)** Representative flow cytometry plot of cell size and cytoplasmic granularity. **(H)** Representative flow cytometry plot showing the amount of CK-7 positive cells. The data are representative of three independent assays.

Figure 3. Term basal plate EVT cells express the main EVT markers similarly to first trimester EVT cells cultured on fibronectin for 48 h (200x). **(A,D,G)** Negative controls of the immunoreactions. **(B-C)** HLA-G staining. **(E-F)** Alpha1-integrin staining. **(H-I)** Alpha5-integrin staining. The data are representative of three independent assays.

Figure 4. Cell viability and mRNA expression of term basal plate EVT cells at different times of culture. Cell viability was analyzed by PI incorporation and Trypan Blue exclusion using complete **(A)** DMEM/F12 and **(B)** IMDM. The data represent the mean $\pm$ SEM of four independent assays. **(C)** Semi-quantitative mRNA expression of

GAPDH, 18S, MMP-2 and MMP-9. The data are representative of three independent assays performed in duplicates.

Figure 5: Term EVT cells maintain their capacity to invade. TGF- β and EGF modulate the invasion of basal plate EVT maintained in **(A)** Matrigel or **(B)** fibronectin coated transwell inserts and cultured for 48 h. The data show the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ *versus* control. **(C)** MMP-2 and MMP-9 activities in the presence of TGF- β and EGF in basal plate EVT cultured for 48 h on Matrigel. The data are representatives of the three independent assays performed in duplicate.

Figure 1

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5