

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área: Análises Clínicas

**Participação dos neutrófilos durante a fase de pré-implantação  
embrionária no desenvolvimento da placenta em camundongos**

Anna Carolina Savioli

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área: Análises Clínicas

**Participação dos neutrófilos durante a fase de pré-implantação  
embrionária no desenvolvimento da placenta em camundongos**

Anna Carolina Savioli

Versão Corrigida

Dissertação de Mestrado para obtenção de título de Mestre

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Sandra H. P. Farsky

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S267p	<p>Savioli, Anna Carolina Participação dos neutrófilos durante a implantação embrionária no desenvolvimento da placenta em camundongos / Anna Carolina Savioli. - São Paulo, 2022. 47 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli</p> <p>1. reprodução. 2. trofoblasto. 3. tolerância materna. 4. placenta. I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Anna Carolina Savioli

Participação dos neutrófilos durante a implantação embrionária no desenvolvimento da placenta em camundongos

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção de Título de Mestre

**Prof. Dr. Sandra Helena Poliselli Farsky**

**Orientador/Presidente**

**Banca Examinadora**

---

1° Examinador

---

2° Examinador

---

3° Examinador

---

4° Examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2022

### **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Farsky pela oportunidade e pelo projeto de mestrado.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Damas Gil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo pela colaboração ao projeto.

À Silvana Sandri, pós doutorada da Universidade de São Paulo, por todo apoio e dedicação ao meu projeto.

À todos os alunos de Pós-graduação do Laboratório Toxicologia e Inflamação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo que me auxiliaram no projeto e contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro concedido ao projeto (processo 130252/2020-4).



## RESUMO

SAVIOLI, A. C. **Participação dos neutrófilos durante a implantação embrionária no desenvolvimento da placenta em camundongos.** 2022. 47f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2022

A implantação do embrião na parede uterina é um processo complexo que consiste na interação do blastocisto com as células epiteliais do útero, e depende de diferentes tipos celulares do microambiente uterino. Embora a literatura mostre a participação de neutrófilos neste processo, os dados ainda são incipientes para proposição da função exata destas células nos períodos iniciais da gestação. Dados do nosso grupo de pesquisa mostraram que neutrófilos pró-angiogênicos induzem a tolerância gestacional, e que a depleção de neutrófilos durante as fases iniciais da gestação prejudica a implantação do blastocisto e a progressão da gestação. Com base nestes resultados, o presente estudo visou investigar se a depleção de neutrófilos na fase pré-receptiva da janela de implantação do blastocisto altera a morfologia placentária. Para tanto, foi utilizado o modelo de gestação alogênica, onde camundongos fêmeas C57BL/6, após cruzamento com machos Balb/C foram tratadas com anticorpo anti-Ly6G ou isotipo no dia 1,5 da gestação (24 horas após a detecção do *plug* vaginal) em dose suficiente para manter a depleção de neutrófilos circulantes por 48 horas (200µg/ 500µL; i.p). No final da gestação (dia 18,5), o sangue periférico foi coletado e, em seguida, os animais foram submetidos a laparotomia para retirada da placenta, a qual foi submetida à análise histológica. As análises dos leucócitos circulantes evidenciaram a efetividade do tratamento para depleção de neutrófilos periféricos. A análise histológica mostrou alterações significativas na morfologia da placenta nos animais tratados com anti-Ly6G. Foram detectadas a redução da zona juncional, de células trofoblásticas e de fatores angiogênicos, como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e das moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e de plaqueta e endotélio (PECAM-1). Esses dados evidenciam a importância dos neutrófilos nos primeiros dias de gestação para o desenvolvimento da placenta.

**Palavras-chave:** reprodução, trofoblasto, tolerância materna, placenta

## ABSTRACT

SAVIOLI, A. C. **Participation of neutrophils during embryonic implantation in the placental development in mice.** 2022. 47f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2022

Blastocyst implantation is a complex process, consisting of the interaction between blastocyst and uterine epithelial cells. Also, it is well known that the implantation site resembles an inflammatory response, with a profusion of recruited immune cells into the endometrial stroma and lumen from the blood. The role of macrophages, natural killers, and dendritic cells have been extensively studied, however, the participation of neutrophils in this process remains unclear. Data from our research group showed that pro-angiogenic neutrophils induced gestation tolerance, also peripheral neutrophils depletion at the time of active placental development led to smaller embryo sizes and abnormal placentation in mice. In this context, the present study aimed to investigate whether pharmacological depletion of neutrophils in mice in the blastocyst implantation phase alters placental morphology. Therefore, C7/BL/6 female mice, after mating with Balb/C males, were treated with an anti-Ly6G antibody or isotype on day 1 of gestation (after detection of the vaginal plug) at a dose sufficient to maintain the depletion of circulating neutrophils for 48 hours (200 µg/500µL; i.p). At the end of the gestational day (day 18), peripheral blood was collected, and then the animals were submitted to laparotomy for the placenta removal and subsequent histological analysis. The analysis of circulating leukocytes from neutrophils depleted mice showed a reduction of peripheral neutrophils up to 48 hours after antibody injection. The histological analysis showed significant alterations in the placenta morphology of the animals treated with anti-Ly6G. The morphometric analyses showed a reduction in the size of neutrophils depleted placenta due to diminished junctional zone and reduction of trophoblast cells. Also, it was observed a reduction of vascular endothelial growth factors (VEGF), reduction of adhesion molecules intracell-1 (ICAM-1), and platelets and endothelium (PECAM-1) positive cells in the junctional zone. In conclusion, these data show the importance of neutrophils on the first days of pregnancy for the development of the placenta.

**Keywords:** reproduction, trophoblast, maternal tolerance, placenta

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Receptividade Uterina e Implantação do Blastocisto</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Placenta: Morfologia e atividade metabólica</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Características e Função .....	6
1.2.2 Formação da placenta .....	9
<b>1.3 Sistema imune na implantação do blastocisto e na formação da placenta...</b>	<b>11</b>
1.3.1. Neutrófilos .....	13
<b>3.1 Tratamento dos animais com anticorpo anti-Ly6G</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2. Coleta do sangue periférico e análise dos leucócitos circulantes</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4 Caracterização do tecido placentário</b> .....	<b>17</b>
3.4.1 Desparafinização .....	17
3.4.2 Coloração hematoxilina-eosina (H&E) .....	17
3.4.3 Coloração PAS (Ácido Periódico de Schiff) .....	18
3.4.4 Imunohistoquímica .....	18
3.4.6 Desidratação e montagem de lâminas .....	19
<b>3.5 Análises morfológicas</b> .....	<b>20</b>
3.5.1 Medidas de áreas da placenta .....	20
3.5.2 Análise Densitométrica .....	20
3.5.3 Contagem de células positivas .....	20
<b>3.6 Análise Estatística</b> .....	<b>20</b>
<b>5. Resultados</b> .....	<b>21</b>
<b>5.1. Efeito do tratamento com Ly6G sobre o número de leucócitos na circulação</b> .....	<b>21</b>
<b>5.2 Índice de sucesso de gestação</b> .....	<b>21</b>
<b>5.3 Efeito da depleção neutrofílica sobre o desenvolvimento da placenta</b> .....	<b>22</b>
<b>5.4 Efeito da depleção de neutrófilos a zona juncional da placenta murina</b> .....	<b>23</b>
<b>5.5 Efeito da depleção neutrofílica sobre células VEGF positivas na placenta</b> ..	<b>24</b>
<b>5.6 Efeito da depleção neutrofílica sobre a expressão de moléculas de adesão</b>	<b>25</b>
<b>6. Discussão</b> .....	<b>26</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>31</b>

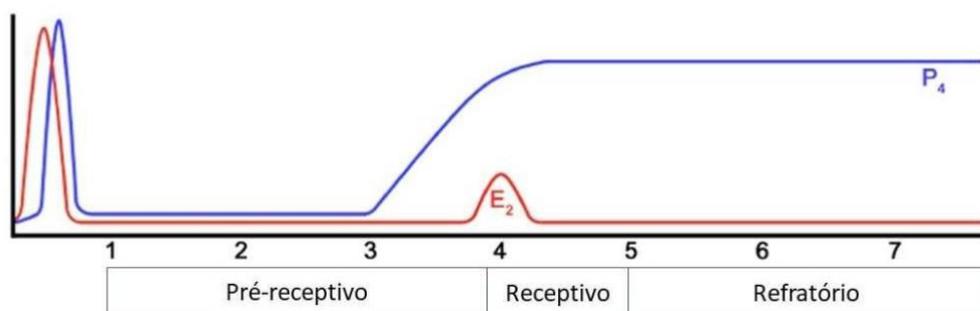
## 1.Introdução

### 1.1 Receptividade Uterina e Implantação do Blastocisto

A implantação do embrião ao útero é um processo complexo e depende de uma interação recíproca entre o epitélio uterino e o blastocisto, o qual é composto de uma massa interior de células e de uma camada de revestimento denominada de trofotoderma e que dará origem à placenta que sustentará o desenvolvimento do embrião.

A interação do blastocisto com as células epiteliais uterinas ocorre viaglicoproteínas de adesão expressas pelo epitélio uterino e pelo trofotoderma, induzidas por diferentes agentes químicos tais como citocinas, prostaglandinas, fatores de crescimentos, hormônios, entre outros (Sharkey & Macklon, 2013). No entanto, para que ocorra a adesão do blastocisto e a sua penetração na parede uterina é fundamental que o endométrio seja receptivo.

Em camundongos a fase de pré-receptividade, ocorre entre compreende o dia 1 e 3 de gestação. No 4° dia de gestação, ocorre a fase de receptividade endometrial induzida pelo aumento dos níveis de progesterona circulante que se segue por um pico de secreção de estrógeno. A partir do 5° dia, o endométrio encontra-se na fase refratária, ou seja, ele não está mais receptivo ao embrião (**Figura 1**). A sincronia entre o desenvolvimento do blastocisto e o endométrio são essenciais para a implantação e o desenvolvimento prenhez. Alterações neste sincronismo podem comprometer o sucesso da gestação (Cha, Sun & Dey, 2012; Matsumoto, 2017; Wang & Dey, 2006).



**Figura 1:** Representação da receptividade uterina murina sob influência dos hormônios progesterona ( $P_4$ ) e estrógeno ( $E_2$ ). Adaptada de Matsumoto. 2017.

A implantação embrionária é um processo multi-mediado que compreende as etapas de aposição, adesão e invasão do epitélio uterino pelas células trofoblásticas durante a fase receptiva. Na aposição, células do trofoectoderma se aproximam ao epitélio uterino luminal. Nessa etapa, ocorre a diferenciação das células estromais das células epiteliais glandulares e luminais, que sofrem transformação secretória. No estroma há aumento da permeabilidade vascular e aumento do fluxo sanguíneo (Weimar *et al.*, 2013; Norwitz *et al.*, 2001). Um grande repertório de fatores de sinalização secretados pelo blastocisto e pelo endométrio nesta fase, como por exemplo, o fator de inibição da leucemia (LIF), citocina pertencente à família das interleucinas (IL-6) capaz de inibir a diferenciação das células-tronco embrionárias de camundongo; o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), que induz proliferação de células estromais; e o fator de crescimento ligado a heparina (HB-EGF), que induz angiogênese (Davidson & Coward, 2016; Hantak *et al.*, 2014).

Esta etapa é seguida pela adesão, onde a interação do blastocisto ao epitélio uterino se torna suficientemente forte para impedir o seu deslocamento pelos fluidos uterinos no lúmen. Nesta fase, há expressão de moléculas de adesão como as claudinas 1, 4 e 5, L-selectina e E-caderina; além da formação dos pinopódios (Kim & Kim, 2017; Davidson & Coward, 2016; Bourgain & Devroery, 2007). A integrina  $\alpha\beta 3$  é uma molécula fundamental neste processo, já que na sua ausência pode causar prejuízos no processo de angiogênese e impossibilitar a implantação do embrião ao endométrio (Davidson & Coward, 2016; Norwitz *et al.*, 2001).

A penetração do blastocisto envolve a invasão do epitélio pelo trofoectoderma, seguida pela diferenciação de células do estroma em células decíduais, conhecida como decidualização, e posterior perda do epitélio luminal (Schlafke & Enders, 1975; Dey *et al.*, 2004). A invasão trofoblástica é regulada por inibidores secretados pelas células decíduais, como o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), inibidor de uPA e os inibidores de MMPs que são regulados positivamente pelo fator de crescimento transformante (TGF)- $\beta$  o qual é secretado pelo blastocisto. O TGF- $\beta$  também exerce influência na expressão de sinais anti-proliferativos para diferenciação dos sinciotrofoblastos, com expressão de características não invasivas na interface materno-fetal (Kim & Kim, 2017; Soares *et al.*, 2018).

A angiogênese endometrial ocorre durante a implantação embrionária, sendo caracterizada pela remodelação das arteríolas em uma rede vascular de baixa

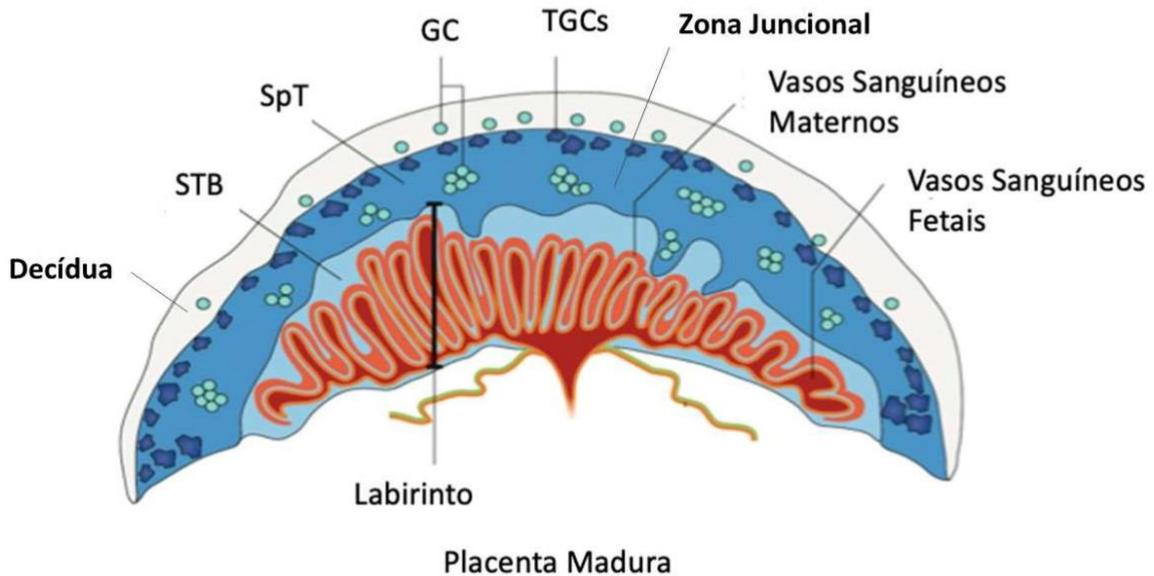
resistência. A regulação ocorre através dos fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e do fator de crescimento placentário (PLGF). Esses fatores estão presentes durante toda a fase de implantação, promovendo a proliferação de células endoteliais, migração celular, apoptose e aumento da permeabilidade vascular. A isoforma A do VEGF encontra-se presente no epitélio uterino, nas células estromais e trofoblásticas. Já o PLGF é secretado pelas células NK (*Natural-Killer*) após a invasão do blastocisto. O mecanismo de ação ocorre pela interação do PLGF com o receptor tirosina quinase (Flt1), promovendo o deslocamento do VEGF para o receptor VEGFR-2, que resulta em aumento da angiogênese (Karizbodagh *et al.*, 2017; Nejabati *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017).

Associados, os dados descritos acima mostram que a implantação do blastocisto é um processo complexo, multi-mediado pela secreção de diferentes mediadores químicos secretados por células do microambiente uterino e pelo blastocisto, que agem para aumentar a adesão entre a parede uterina e o blastocisto bem como a modular a angiogênese, a qual é essencial para o desenvolvimento do embrião.

## **1.2 Placenta: Morfologia e atividade metabólica**

### **1.2.1 Características e Função**

A placenta é um órgão primordial para formação do feto ao longo da vida embrionária. Em camundongos, ela é formada por 3 regiões: decídua materna, zona juncional, e labirinto (**Figura 2**) (Cross *et al.*, 2002; Hemeberg *et al.*, 2018, 2020).



**Figura 2:** Representação Esquemática da Placenta Madura Murina. A placenta é composta de decídua; células trofoblásticas gigantes (TGCs), células espongiotrofoblásticas (SpT) e células de glicogênio (GCs) pertencentes à zona juncional; células do sinciciotrofoblasto (STB) pertencentes ao labirinto e placa coriônica. Adaptação de Hemberg *et al.* 2020.

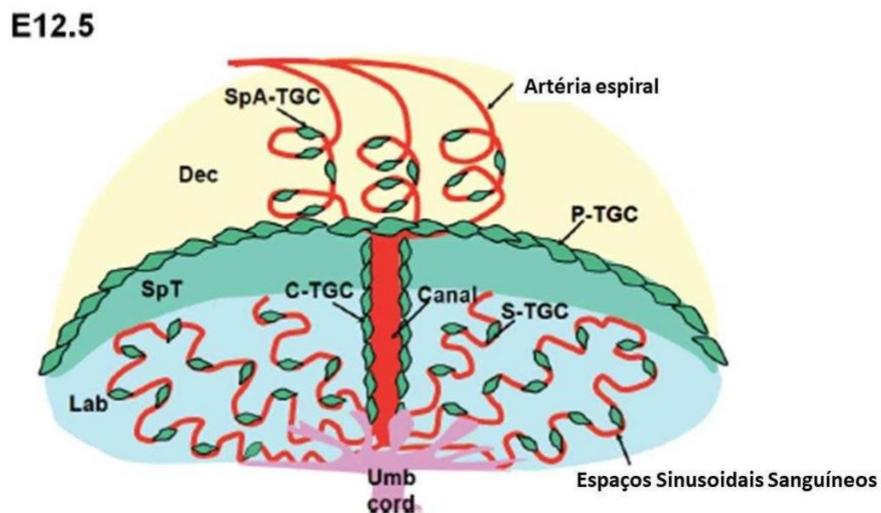
### *Decídua*

A decídua materna é formada pelo processo de decidualização das células estromais em deciduais, caracterizadas como células epiteliais justapostas, volumosas, poliédricas e produtoras de hormônios. Essa camada também desempenha funções imunológicas e interage diretamente com as células trofoblásticas formando a interface materno-fetal, sendo regulada pelos níveis de estrogênio e progesterona. (Cross *et al.*, 2002; Hemeberg *et al.*, 2018, 2020).

### *Zona Juncional*

A zona juncional é caracterizada por células trofoblásticas gigantes (TGCs), células de glicogênio (GCS) e espongiotrofoblastos (SpT). As TGCs são células poploides, de grandes dimensões e são subdivididas em 4 subtipos: TGC parietais, cujas células interagem com sistema imune materno e células deciduais, facilitando a invasão da camada trofoblástica, bem como a decidualização do endométrio; TGC-artérias espiraladas e TGC-canais de sangue materno, responsáveis pelo remodelamento vascular arterial materno; e TGC-sinusoidal, responsável pela modulação hormonal e de fatores de crescimento (**Figura 3**). As funções dos TGCs são: mediar a adesão do

blastocisto ao útero, invasão trofoblástica, remodelamento vascular com secreção de fatores angiogênicos e remodelamento tecidual. Estas células também participam dos mecanismo de tolerância imunológica, produzindo citocinas importantes como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), também liberada pelas células NK (Simmons & Cross, 2005; Cross *et al.*, 2010).



**Figura 3:** Células Trofoblásticas e a interação materno-fetal no 12.5 dia de gestação murina. Dec- decídua; SpA-TGC- artéria espiralada associada às células trofoblásticas gigantes; P-TGC- células trofoblásticas gigantes parietais; SpT- espongiotrofoblásticas; C-TGC- canal de células trofoblásticas gigantes; S-TGC- células trofoblásticas gigantes sinusoidais; Lab- labirinto; umb cord- cordão umbilical. Adaptado de Cross *et al.* 2010.

As células de glicogênio são células derivadas das células espongiotrofoblásticas a partir do dia 12.5, e possuem fenótipo migratório, o que possibilita sua migração para a decídua materna ao redor das artérias espiraladas maternas, longe da área de invasão trofoblástica (Tunster *et al.*, 2020). Estas células armazenam glicogênio, sendo esta substância essencial para energia de manutenção celular. Por fim, as SpT, derivadas do cone ectoplacental, em conjunto com as TGCs, tem função pouco conhecida. Sugere-se que estas células atuem como um suporte estrutural para a formação do labirinto e possuem atividade endócrina (Simmons & Cross, 2005, Soares *et al.*, 2018).

Tanto as TGCs quanto as SpTs são capazes de secretar matriz extracelular, proteínas, moléculas de adesão, citocinas, como fatores angiogênicos (VEGF e PLGF), fatores de remodelamento tecidual (MMP9) e hormônios, como glicoproteínas semelhantes a prolactina, regulando a hematopoiese (Cross *et al.*, 2002, 2010).

### *Labirinto*

O labirinto consiste na região de maior área da placenta. Nele são encontrados os vasos fetais e canais sinusoidais maternos, formando uma rede vascular e permitindo a troca de nutrientes entre mãe e feto. Esses vasos estão envolvidos por duas camadas de sinciotrofoblasto (STB), a qual atua como barreira entre o sangue fetal e o sangue materno. (Cross *et al.*, 2002; Hemeberg *et al.*, 2018, 2020).

A principal função da placenta consiste em realizar trocas metabólicas e gasosas entre o organismo materno e fetal (Griffiths & Campbell, 2015; Lewis & Cleal, 2016). Outra função relevante está relacionada à tolerância imunológica, as quais envolvem neutrófilos, células NK, células T efetoras (Tef), células T regulatórias (Treg) e macrófagos. As células da resposta imune inata possuem a finalidade de proteger tanto o feto quanto a mãe de infecções, como por exemplo infecção do parasita *Toxoplasma gondii*, capaz de alterar as células de defesa maternas, e atuam em conjunto com a barreira de sinciotrofoblasto (Ander *et al.*, 2019; Tunster *et al.*, 2020). Embora os componentes da resposta adaptativa desempenhem um papel crucial na manutenção da tolerância materno-fetal, componentes do sistema inato também têm sido propostos como importantes reguladores destes eventos tolerogênicos (Nadkarni *et al.*, 2016, 2021).

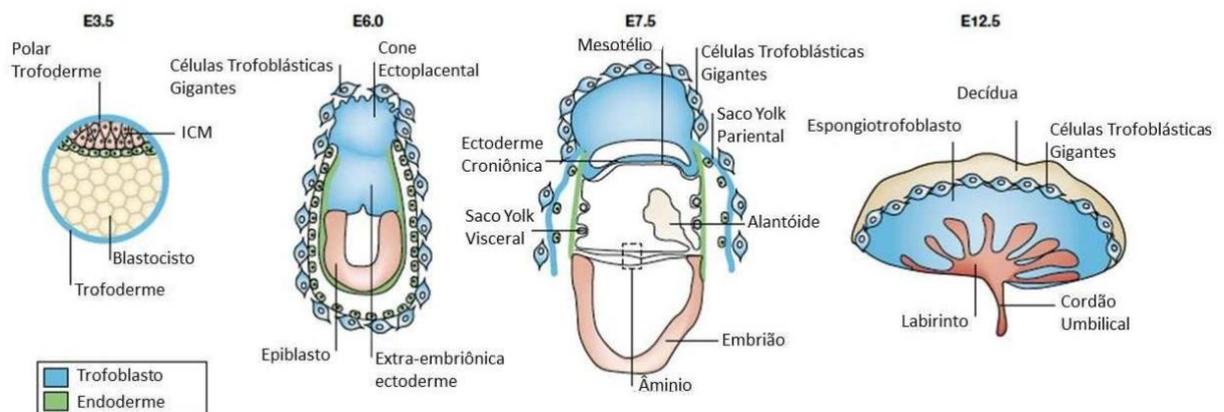
### **1.2.2 Formação da placenta**

Em camundongos, o desenvolvimento placentário é um processo complexo e tem início com a adesão do blastocisto no endométrio e sua decidualização. Nesse período, o útero encontra-se receptivo para adesão do blastocisto, um evento mediado pela ação de estrogênios e progesterona, também envolvidos na proliferação e diferenciação das células estromais, células justapostas e volumosas (Cross *et al.*, 2002)

No período de implantação, ocorre a diferenciação da camada trofodérmica, que envolve a massa celular interna. Esta camada externa do blastocisto, prolifera e se diferencia em ectoderma extra-embriônico e cone ectoplacentar, cujas as células periféricas também se diferenciam em TGCs. (Cross *et al.*, 2002).

No dia 8,5 de gestação ocorre a fusão corioalantóide regulada pela secreção de TGF- $\beta$ . Essa etapa é essencial para maturação da placenta, visto que ela permite o a

diferenciação vascular, ao redor da qual as células trofoblásticas formam uma rede anastomosa denominada de labirinto placentário. O labirinto é composto internamente por células do STB, as quais funcionam como barreira placentária primária, permitindo a troca de nutrientes essenciais e o bloqueio de substância tóxicas ao feto (Lweis & Cleal, 2016). Revestem estas camadas sinciais, TGC-sinusoidais. (**Figura 4**) (Cross *et al.*, 2002; Hemberger *et al.*; 2018, 2020; Isaac *et al.*; 2014).



**Figura 4:** Desenvolvimento da placenta em camundongos. E3.5; 6.0; 7.5; 12.5 dias após a visualização do plug vaginal. Adaptação de Cross *et al.* 2001.

Para que ocorra uma invasão trofoblástica bem-sucedida, é necessária a expressão de moléculas de adesão (*cell adhesion molecules; CAM*) pelo trofoblasto, estas moléculas estão envolvidas na adesão do blastocisto ao epitélio uterino durante as fases iniciais da implantação, assim como na fase de invasão endometrial. As moléculas de adesão são geralmente divididas em quatro grupos: integrinas, selectinas, caderinas e membros da superfamília de imunoglobulinas (IgSF). As CAMs se diferenciam pela forma de atuação, as integrinas normalmente se ligam à matriz extracelular, já as selectinas, caderinas e membros de IgSF atuam através da adesão célula-célula. (Harjunpää *et al.*, 2019).

Ainda, algumas IgSF, como as moléculas de adesão intercelular (ICAMs), as quais são expressas em fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e leucócitos. A regulação positiva de ICAM-1 tem sido associada a várias doenças inflamatórias, autoimunes e alérgicas devido a mediação da transição de leucócitos ao local inflamado. (Harjunpää *et al.*, 2019). Um outro tipo de IgSF, são as PECAM-1, molécula de adesão celular endotelial-1, também encontradas em células trofoblásticas e do sistema imune,

sendo relacionada com a migração de leucócitos e angiogênese (Zhi *et al.*, 2019; Goldman-Wohl & Yagel, 2002).

Em camundongos, o processo de maturação da placenta ocorre em duas fases: a primeira fase acontece entre os dias 8.5 e 10.5, e a segunda ocorre entre os dias 10.5 e 14.5. Como já descrito, a primeira fase é caracterizada pela formação das seguintes estruturas: labirinto; zona juncional e decídua materna. No entanto, a placenta continua sua expansão ao longo do desenvolvimento do feto, chamada de segunda fase, para uma completa maturação através de secreção de mediadores químicos, como VEGF, PLGF, fator de crescimento de fibroblasto básico (b-FGF), e membros das famílias TGF $\beta$  e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Andes *et al.*, 2019; Hemberger *et al.*; 2018, 2020; Barut *et al.*, 2010).

Placenta com defeitos na remodelação tecidual, vascular ou na angiogênese apresentam redução do número de espaços sanguíneos fetais e/ou maternos, o que está diretamente relacionada ao desenvolvimento de restrição de crescimento intrauterino e a pré-eclâmpsia (Kim & Kim, 2017; Hemberger *et al.*; 2018, 2020; Barut *et al.*, 2010).

### **1.3 Sistema imune na implantação do blastocisto e na formação da placenta**

A implantação é considerada um processo inflamatório necessário para adesão do blastocisto e desenvolvimento embrionário. Para que ela seja bem-sucedida, deverá ocorrer uma interação entre o sistema imune, com o auxílio dos leucócitos (células NK, células dendríticas, neutrófilos e células T) (Ander *et al.*, 2019). Essa interação trofoblasto-sistema imune leva a um estado tolerogênico que permite o desenvolvimento gestacional. Ela ocorre tanto na decídua materna quanto na região do labirinto, entre vasos fetais e maternos.

No período de receptividade uterina inicia-se um processo inflamatório, caracterizado pela ativação dos leucócitos maternos recrutados tanto pelas células deciduais quanto pelas células trofoblásticas. Dentre os leucócitos, destacam-se as células NK deciduais, as quais auxiliam na implantação do blastocisto, no remodelamento das artérias espiraladas e na invasão trofoblástica, além da liberação de fatores angiogênicos e fatores de crescimento. Macrófagos deciduais também desempenham um papel importante no microambiente uterino, sendo as primeiras células de reconhecimento de antígeno a chegarem no local, que também auxiliam na invasão trofoblástica pela produção de VEGF e MMP9 e na proteção do feto contra infecções

microbianas pela expressão dos receptores *scavengers* CD163, CD206 e CD209 (Ander *et al.*, 2019).

Outras células importantes são os neutrófilos, envolvidos no recrutamento das células T. Em humanos, altas concentrações de neutrófilos, em especial os que liberam NETs (*neutrophil extracellular traps*), estão associados a gravidez pré-eclâmpsia, diminuição da invasão trofoblástica e desenvolvimento defeituoso da placenta. Os neutrófilos decíduais atuam na remodelação tecidual e vascularização placentária através da secreção de citocinas como MMP9 e EROS (Espécies Reativas de oxigênio), auxiliando a implantação do embrião. Ademais, eles adquirem um fenótipo próangiogênico, produzindo VEGF-A, ARG-1 e CCL2 e induzindo a formação de redes vasculares (Nadkarni *et al.*, 2021)

Um outro tipo celular encontrado são as células Treg específicas ao feto, responsáveis pela tolerância aos antígenos fetais, auxiliando na manutenção da homeostasia e propicia a sobrevivência fetal. A diminuição destas células está relacionada à diminuição de reabsorção fetal e ao insucesso da gestação (Huang *et al.*, 2020). A origem dessas células Treg específicas do feto podem estar ligadas à exposição de antígenos maternos não herdados (NIMAs), visto que as gestações são mais bem-sucedidas quando provêm de cruzamentos alogênicos (Ander *et al.*, 2019).

Após o período de implantação, ocorre a transição de uma resposta pró-inflamatória para uma tolerância imune anti-inflamatória. Há uma mudança do perfil das células T helper 1 (Th1) para T helper 2 (Th2) e, conseqüentemente, o aumento de células Tregs, as quais atuam como imunossupressoras, suprimindo a ativação de células T efetoras por mecanismos de contato celular ou pela secreção de citocinas e, conseqüentemente, protegendo o feto de uma rejeição imunológica materna. Alterações nas populações de células T estão associadas a complicações na gravidez, apesar dos mecanismos de sinalização entre as células imunes e não imunes e alterações de fenótipos não serem totalmente conhecidos (Huang *et al.*, 2020; Nadkarni *et al.*, 2021).

O final da gestação é caracterizado por ser uma resposta pró-inflamatória caracterizada pela diminuição das células Tregs e aumento das células T (TCD4 e T helper 17), macrófagos, NK e neutrófilos. O perfil de células pró-inflamatórias no período final da gestação é fundamental para a expulsão do feto no momento do parto (Huang *et al.*, 2020; Ander *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2014).

### 1.3.1. Neutrófilos

Os neutrófilos são fagócitos polimorfonucleares, fundamentais na resposta imune inata. São produzidos e maturados na medula óssea e entre  $5 \times 10^{10}$  e  $10 \times 10^{10}$  neutrófilos são liberados para a circulação sanguínea diariamente, onde possuem meia vida de até 24 horas. São as primeiras células a chegarem no foco da lesão inflamatória, eliminando agentes estranhos e/ou microrganismos pela fagocitose, pinocitose, geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, além de recrutarem outras células de defesa através da secreção de mediadores quimiotáticos (Crocker *et al.*, 2000; Repka *et al.*, 2019; Greer *et al.*, 2004).

Assim como os clássicos macrófagos M1 e M2, diferentes fenótipos de neutrófilos foram identificados no ambiente tumoral e em microambientes de doenças de origens inflamatórias e cardiovasculares, como derrames (Piccardi *et al.*, 2011). Os subtipos de neutrófilos foram designados como N1 (anti-tumoral ou pró-inflamatório) e N2 (prótumoral ou anti-inflamatório). Os neutrófilos N1 são caracterizados pelo aumento da secreção de TNF- $\alpha$  e de citocinas, como interleucina-12 (IL-12), ligante 3 de quimiocina (CCL3), expressão de Fas e da ICAM-1, além de induzir ativação dos linfócitos T/CD8. Por outro lado, estes também apresentam diminuição da expressão de arginase, ligantes de quimiocina 2 e 5 (CCL2 e CCL5), do VEGF, do receptor da quimiocina CXCR4 (CXCR4) e de MMP-9. Portanto, neutrófilos com fenótipo N1 promovem citotoxicidade, rejeição tumoral e memória imune (Sino *et al.*, 2014). Já o fenótipo N2 é induzido pelo TGF- $\beta$ , bloqueia a polarização para o fenótipo N1 e induz a expressão de VEGF, CXCR4, ligantes de quimiocina 2, 3, 12 e 17 (CCL2, CCL3, CCL12, CCL17), B/MMP-9, FOXO1 (*forkhead box protein O 1*) e anexina A1 (AnxA1) (Fridlender *et al.*, 2009; Nadkarni *et al.*, 2016; Garcia-Culebras *et al.*, 2019). Assim, os neutrófilos com fenótipo N2 promovem crescimento do tumor, angiogênese, invasão tumoral, metástase, imunossupressão.

Embora a literatura sobre a participação dos neutrófilos nas diferentes fases da gestação ainda esteja em crescimento, dados mostram que, em especial no segundo trimestre da gestação humana, os neutrófilos desempenham um papel importante na regulação do microambiente uterino, favorecendo um ambiente inflamatório para que ocorra a expulsão do feto no momento do parto (Zenclussen & Hammerling, 2015). É importante ressaltar que os estudos diferem quanto ao papel destas células no processo de implantação do blastocisto e na formação da placenta. Enquanto muitos trabalhos

demonstram uma crucial participação dos macrófagos e células dendríticas para o processo (Zenclussen & Hammerling, 2015), a evidência mais forte sobre a participação dos neutrófilos está pautada na importância do mesmo para a indução da angiogênese e a liberação MMP-9, a qual está envolvida na invasão do trofoblasto e na decidualização materna (Daimon & Wada, 2005).

Os neutrófilos são responsáveis pela secreção de mediadores químicos, como VEGF-A, TGF- $\beta$ , prostaglandina e MMP e pela expressão de ICAM-1, promovendo a angiogênese através de contato célula-célula ou por efeito indireto pelos mediadores químicos citados. O VEGF-A é liberado pela degradação de componentes de matriz pela proteína efetora MMP9, secretada por neutrófilos. A maior expressão de VEGF está diretamente associada ao aumento da vascularização tecidual (Herath *et al*, 2016). Além disso, em decorrência da sua plasticidade e capacidade de se moldar ao microambiente, neutrófilos também podem ser diferenciados em N2 pela presença do hormônio estrógeno, encontrado em altas concentrações durante a gravidez. Neste estudo, os neutrófilos com fenótipo N2, foram responsáveis pela secreção de proteínas, como a FOXO1. Essa proteína é um fator de transcrição importante e promove a expressão de FoxP3 em células T, o que ocasiona ativação das células pró-angiogênicas Treg. A ausência de neutrófilos levou a tamanhos menores de embriões e uma placentação anormal em camundongos, indicando uma participação essencial dos neutrófilos não só para a maturação da placenta, como também para o desenvolvimento vascular do feto. Ainda, esse fenótipo favorece um ambiente pró-angiogênico pela liberação de citocinas, como interleucinas IL-10 e IL-17, responsáveis pelo desenvolvimento de vasos sanguíneos fetais e pela invasão do trofoblasto no endométrio materno, respectivamente. Um fator adicional relacionado a angiogênese é a liberação do VEGF, principalmente pelos neutrófilos N2 (Nadkarni *et al.*, 2016).

Embora os dados ainda sejam escassos, é possível inferir que neutrófilos sejam necessários para desenvolvimento da placenta, os quais parecem ser essenciais para que ocorra uma invasão trofoblástica coordenada e uma adequada remodelação das artérias espirais maternas. Esta hipótese tem sido recentemente investigada, e dados bem recentes mostram que as células trofoblásticas secretam mediadores que induzem a polarização de neutrófilos para o fenótipo pró-angiogênico (Calo *et al.*, 2020).

Resultados recentes do nosso laboratório mostram que a depleção neutrofílica no período de pré-implantação embrionária reduziu a taxa de sucesso na gestação, e que

fetos que alcançaram o final de gestação apresentaram alterações na sua formação (Hebeda *et al.*, em redação). Associados, os dados apresentados sugerem que os neutrófilos podem ser atores importantes na implantação do blastocisto e na formação da placenta.

## 2. Objetivo

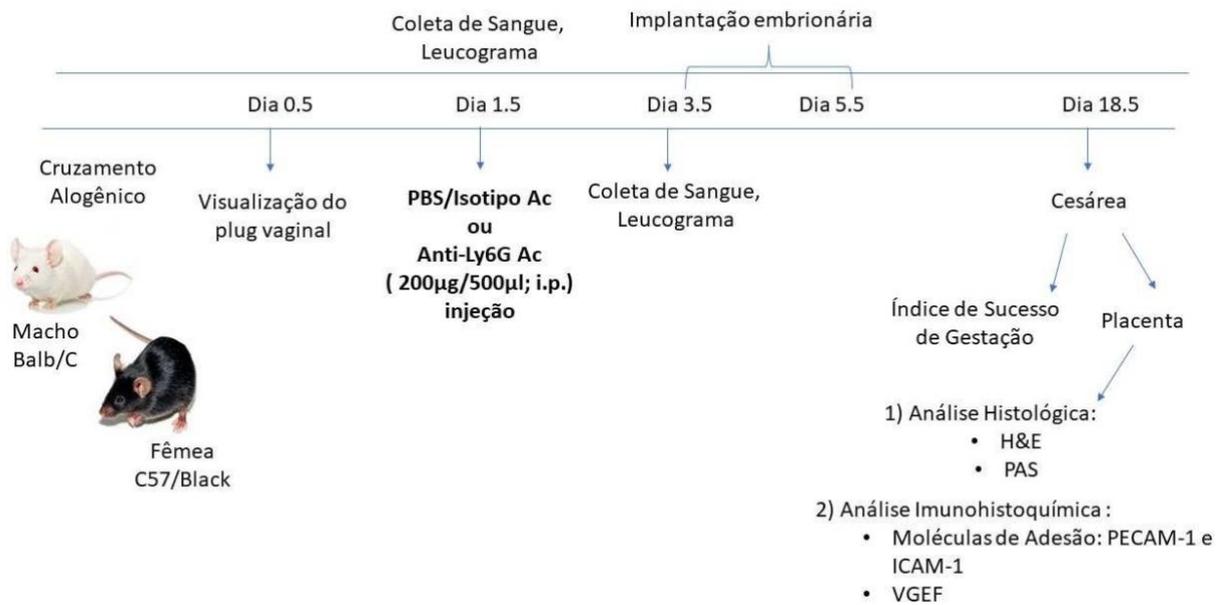
Investigar se a depleção farmacológica de neutrófilos no início da fase de implantação do blastocisto interfere no desenvolvimento da placenta em camundongos.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1 Tratamento dos animais com anticorpo anti-Ly6G

Camundongos C57/BL/6 fêmeas adultas (2 meses, 20 g) foram cruzadas com machos Balb C adultos (2 meses, 20 g) ambos provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em salas com temperatura controlada (22 - +25°C), u midade constante (60%) e ciclos controlados (claro/escuro 12 horas cada), tendo ração e água ad libitum.

A detecção do *plug* vaginal foi considerada no dia 0.5 da gestação. As fêmeas prenhas foram tratadas com anticorpo monoclonal anti-Ly6G (200 µg/500 µL; i.p.; clone RB6-8C5; e-Bioscience/Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA), ver ação do anticorpo ou anticorpo de controle - isotipo correspondente (200 µg/500 µL; clone eB149/10H5; Rt IgG2b k; e- Bioscience/Invitrogen) no dia 1 da gestação (**Figura 5**). O projeto foi aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP (CEUA/protocolo número 557).



**Figura 5:** Delineamento Experimental

### 3.2. Coleta do sangue periférico e análise dos leucócitos circulantes

Para certificação da depleção dos neutrófilos, no dia 03, os animais foram anestesiados com xilazina e Ketamina (7 mg / kg e 77 mg / kg, respectivamente; i.p; Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) e submetidos à punção da aorta para coleta do sangue periférico com uso de anticoagulante (EDTA 0,1 mM). Após a coleta o sangue total foi lisado com cloreto de amônio 0,1 M para obtenção dos leucócitos totais. A caracterização das células circulantes foi realizada através da marcação com anticorpos anti-CD3 (linfócitos T), F4/80 (monócitos) e Ly6G (neutrófilos) (1:50; BD-bioscience, EUA) e analisados por citometria de fluxo (BD- Accuri-C6, EUA), onde 10 mil eventos foram recordados para análise (Programa Flow Jo). Os dados foram expressos em porcentagem de células positivas. (n=3)

### 3.3 Coleta de amostras de placentas

As fêmeas prenhes foram anestesiadas com xilazina e Ketamina (7 mg / kg e 77 mg / kg, respectivamente; i.p; Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) e submetidas a laparotomia no dia 18 da gestação para coleta das placentas as quais foram submetidas à análise

morfológica. Os tecidos foram lavados com tampão fosfato alcalino (PBS) por duas vezes e fixados em formol 10% (Sigma-Aldrich, CA, EUA) e paraformaldeído 4% (SigmaAldrich, CA, EUA) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 por 24 horas para as técnicas de caracterização do tecido placentário. Após a fixação, os tecidos foram lavados em água corrente por 10 minutos para retirar o excesso dos fixadores. Os tecidos foram então incluídos em parafina líquida a 60°C (Histosec- Mer ck Chemicals, Alemanha) por 16 horas. Após a solidificação da parafina, os blocos contendo os tecidos placentários foram cortados em micrótomo automático Leica RM2165 e RM 2245 (Leica, Alemanha) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, respectivamente, produzindo cortes sequenciais de aproximadamente 5 µm. Os cortes foram cuidadosamente assentados em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60°C por 1 hora para melhor adesão à lâmina.

### **3.4 Caracterização do tecido placentário**

#### **3.4.1 Desparafinização**

A desparafinização foi realizada por imersões do tecido em Xilol (I e II; Synth, São Paulo, SP, Brasil) por 20 min cada e seguida de hidratação, realizada com a seguinte sequência: etanol absoluto (I, II e II; Synth, São Paulo, SP, Brasil), etanol 90% e 70% por 1 min cada e, por fim, água destilada por 5 min. Os reagentes empregados foram obtidos do laboratório de Imunotoxicologia e de inflamação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

#### **3.4.2 Coloração hematoxilina-eosina (H&E)**

Primeiramente, foram adicionadas 1 ou duas gotas de solução de Hematoxilina de Harris (EsayPath, São Paulo, SP, Brasil) sobre o corte e ficou agindo por 2 min. O excesso de corante foi removido por lavagem com água. Em seguida, foi adicionado 1 gota de diferenciador (solução ETOH 70% + HCL1% na proporção 1:1) sobre o corte por 1 segundo. As lâminas foram imersas em cuba de vidro em etanol 90% (Synth, São

Paulo, SP, Brasil) por 1 min. O excesso de etanol foi removido por água corrente. Depois, foram adicionadas 1 ou 2 gotas de solução de eosina amarelada 1% (WCor Corantes, São Paulo, SP, Brasil) sobre o corte, a qual ficou agindo por 3 min. As lâminas foram lavadas em água corrente para remoção do excesso de corante. Os reagentes empregados foram obtidos do laboratório de Imunotoxicologia e de inflamação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

### 3.4.3 Coloração PAS (Ácido Periódico de Schiff)

Primeiramente, foram adicionados sobre o corte de tecido 10 gotas do reagente A ou o suficiente para cobrir o corte. Depois, foi feita a etapa de lavagem em água corrente por 3 min, seguida de lavagem em água destilada. Após, foi adicionado sobre o corte de tecido 10 gotas do reagente B ou o suficiente para cobrir o corte, e foi esperado 15 min em câmara escura. Em seguida, foi feita a etapa de lavagem em água corrente por 3 min. Em seguida, foram adicionadas 10 gotas do reagente C ou o suficiente para cobrir o corte de tecido e deixado agir por 3 min. Em seguida, foi feita a etapa de lavagem em água corrente por 3 min e colocado para secar em temperatura ambiente. Os reagentes utilizados foram: A- ácido periódico; B- reagente de Schiff; C- Hematoxilina de Harris conforme o kit (EasyPath Diagnóstics Histokit PAS #-11-20014). Os reagentes empregados foram obtidos do laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP.

### 3.4.4 Imunohistoquímica

Para análise imunohistoquímica da placenta foram utilizados os marcadores VEGF, PECAM -CD31 e ICAM como anticorpos primários e *anti-rabbit* e *anti-goat* como secundários (**Tabela 1**).

Anticorpo	Código	Marca	País	Diluição
VEGF	MA532038	Invitrogen	EUA	1:200
PECAM-1	sc1506	Santa Cruz	EUA	1:25
ICAM-1	sc1511	Santa Cruz	EUA	1:25

Anti-rabbit	NA9340	Abcam	EUA	1:250
Anti-goat	HAF109	R&D Systems	EUA	1:100

**Tabela 1:** Anticorpos utilizados para análise Imunohistoquímica.

Primeiramente, foi realizado o resgate antigênico, etapa em que as lâminas ficam sobre solução de Citrato 0,01M pH6, por 20 min a 96°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas com TBS\_Tween 20 (Solução Salina Tamponada Tris; 0,025%; Synth, São Paulo, SP, Brasil) por 5 min. Em seguida, foi realizado a permeabilização do tecido com solução de Triton X 0,01% (Sigma Aldrich, CA, USA) por 10 min e uma etapa de lavagem das lâminas em solução TBS\_Tween 20 (0,025%) por 3 vezes de 2 min. cada. Após, foi realizado a etapa de bloqueio de peroxidases, etapa em que é adicionado solução 3% de Peróxido de Hidrogênio (Synth, São Paulo, SP, Brasil) por 10 min. Essa etapa foi repetida 3 vezes e seguida de etapa de lavagem em solução TBS\_Tween 20 (0,025%) por 3 vezes de 2 min. cada. Em seguida, foi realizada o bloqueio de sítios inespecíficos pela incubação das lâminas em solução TBS\_Tween 20 (0,025%) acrescido de 1%BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, CA, USA) por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a incubação do anticorpo primário VEGF 1:200, PECAM-CD31 1:25 e ICAM 1:25 preparados em solução TBS\_Tween 20 (0,025%) acrescido de 1%BSA e mantidos à 4°C, *overnight*. Após, foi feita a incubação com anticorpo secundário *anti-rabbit* 1:250 e *anti-goat* 1:100 em solução com TBS\_Tween 20 (0,025%) acrescido de 1%BSA, por 1h em temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a etapa de revelação, na qual foi adicionado solução de DAB (DAKO, CA, EUA) por 1 min sobre o corte, seguida de etapa de lavagem em água destilada para cessar a reação. Em seguida, foi feita a etapa de contra coloração, em que foi adicionada Hematoxilina de Harris previamente filtrada por 40s sobre o tecido, seguida de etapa de lavagem em água para parar a reação. Os reagentes empregados foram obtidos do laboratório de Imunotoxicologia e de inflamação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

### 3.4.6 Desidratação e montagem de lâminas

Para desidratação as lâminas foram mergulhadas em solução de álcool (Synth, São Paulo, SP, Brasil) na seguinte sequência: etanol 70%, etanol 90%, etanol absoluto

(I, II e III) por 1 min cada. Em seguida, elas foram mergulhadas em Xilol I e II (Synth, São Paulo, SP, Brasil).

Para montagem das lâminas, foi adicionado 1 gota de Entellan<sup>®</sup> (Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha) sobre o corte e a lamínula. Deixar secar por 30 min na capela. Os reagentes empregados foram obtidos do laboratório de Imunotoxicologia e da Inflamação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

### **3.5 Análises morfológicas**

#### **3.5.1 Medidas de áreas da placenta**

Para medição das áreas da placenta foi utilizado o software analisador de imagens do microscópio AXIOSCOP 2 (Zeiss<sup>®</sup>, Alemanha) do laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP. Foram analisados 6 campos de cada corte em aumento de 4,5x. (n=6)

#### **3.5.2 Análise Densitométrica**

Análises densitométricas foram utilizadas para quantificação de cor na coloração PAS e na marcação de VEGF. Para isto, foram analisados 5 campos de cada corte pelo software Image J<sup>®</sup>. (n=6) Foi feita uma dupla análise.

#### **3.5.3 Contagem de células**

A contagem de células positivas foi utilizada para quantificar o número de células Glicogênio e células Trofoblásticas Gigantes na coloração de PAS, células PECAM positivas e células ICAM positivas nas análises imonohistoquímicas. Para isto, foram analisados 6 campos de cada corte em aumentos de 20x pelo software Image J<sup>®</sup>. (n=6). Em seguida foi feita uma razão pela área delimitada. Foi feita uma dupla contagem.

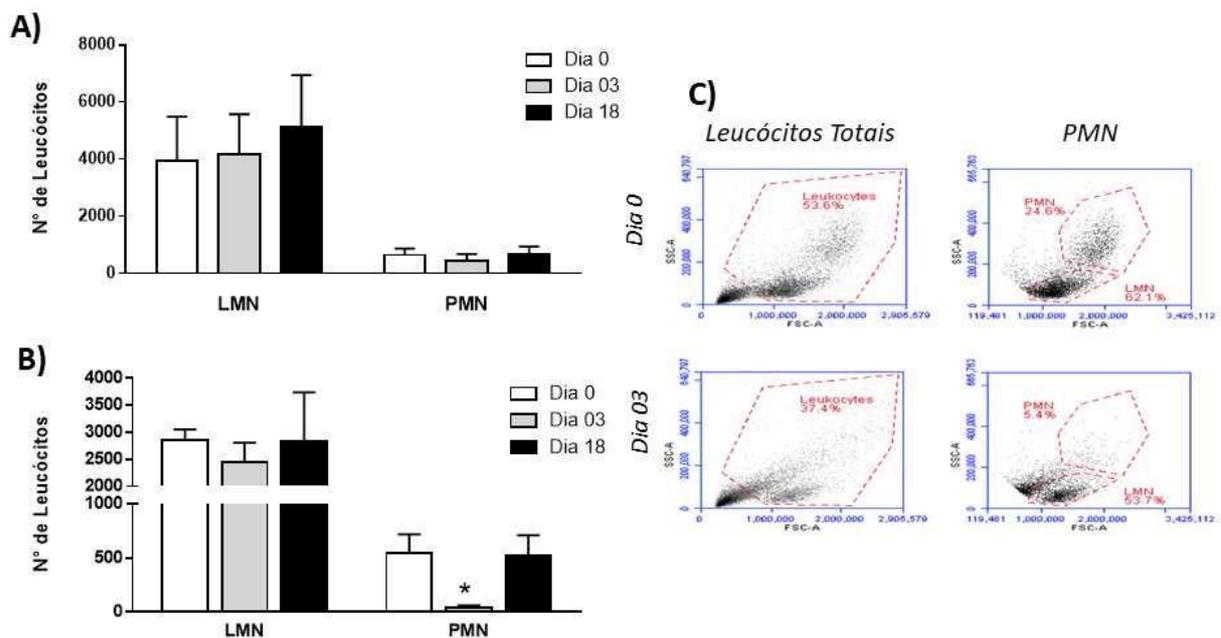
### **3.6 Análise Estatística**

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados estatisticamente pelo teste “t” de student ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer quando necessário. Todos os cálculos foram realizados com o GraphPad Prism 7<sup>□</sup> (GraphPad Software, CA, EUA). O nível de significância foi considerado quando  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1. Efeito do tratamento com Ly6G sobre o número de leucócitos na circulação

A depleção de neutrófilos foi mantida até 48 horas após a injeção intravenosa de anticorpo Ly6G. A administração do isotipo não afetou o número de leucócitos circulantes (**Figura 6**).



**Figura 6:** Número de leucócitos circulantes no sangue periférico de camundongos fêmeas C57Bl/6 prenhas previamente acasaladas com machos Balb C no dia 0 (antes do tratamento) e no dia 3 da gestação, 48 horas após o tratamento com isotipo (200 $\mu$ g/500  $\mu$ L; i.p.) ou anticorpo anti-Ly6G (200 $\mu$ g/500  $\mu$ L; i.p.) e no 18 dia (laparotomia) (**A e B**). Os dados foram analisados por citometria de fluxo usando anticorpos anti-Ly6G (**C**). Os dados expressam a média  $\pm$  e.p.m. (n=3). \* $P < 0,01$  vs antes do tratamento (dia 0). (Anova one way). LMN= mononucleares; PMN=polimorfonucleares

### 5.2 Índice de sucesso de gestação

Para avaliar o sucesso da gestação, foi utilizada a seguinte fórmula: número de fêmeas com fetos na cesárea /número de fêmeas com plug vaginal x100. No dia 18.5 da gestação, observou-se que a depleção de neutrófilos circulantes reduziu o número de sucesso na gestação, mensurado pela razão do número de fêmeas que tinham feto no dia da laparotomia em relação as que tinham *plug* vaginal.

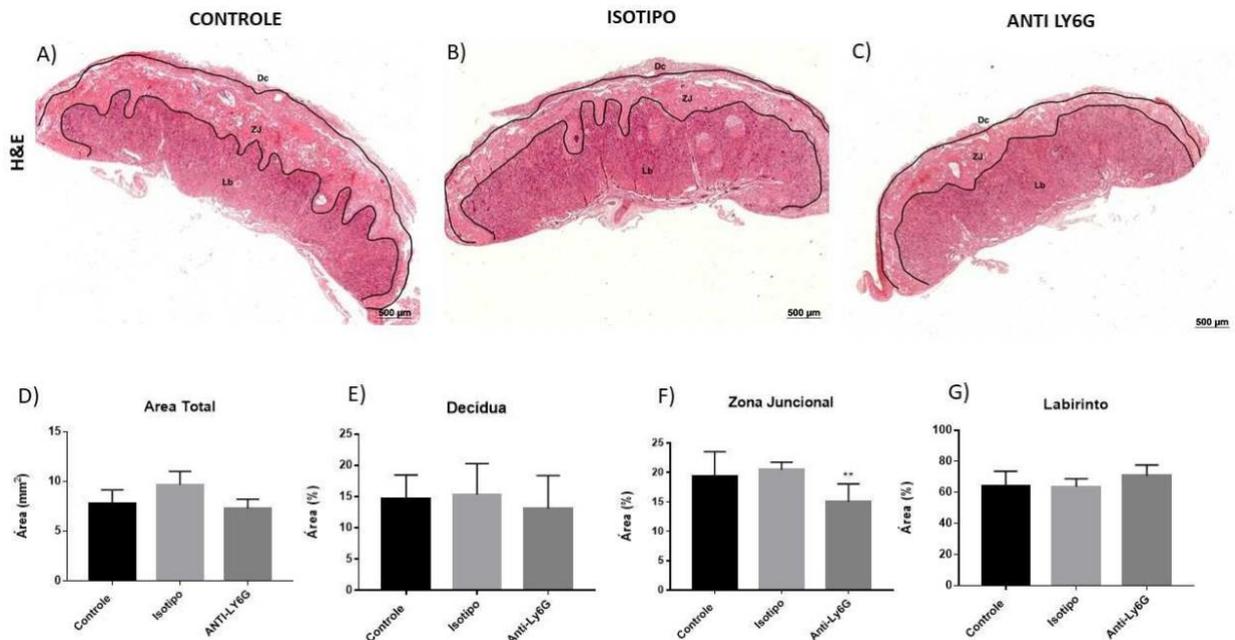
Das fêmeas tratadas com isotipo, 7 tinham *plug* vaginal e destas 6 tinham feto, e das fêmeas tratadas com Ly6G, 10 tinham *plug* vaginal e destas só 4 tinham feto. Assim, a percentagem de sucesso nas tratadas com isotipo foi de 86% e nas tratadas com Ly6G foi de 40% (**Tabela 2**).

Tratamento	N° plug vaginal	N° de fêmeas com feto na cesárea	% de sucesso
Isotipo	7	6	86
Anti-Ly6G	10	4	40

**Tabela 2:** índice de sucesso na gestação. Fórmula utilizada: número de fêmeas com fetos na cesárea /número de fêmeas com plug vaginal x100.

### 5.3 Efeito da depleção neutrofílica sobre o desenvolvimento da placenta

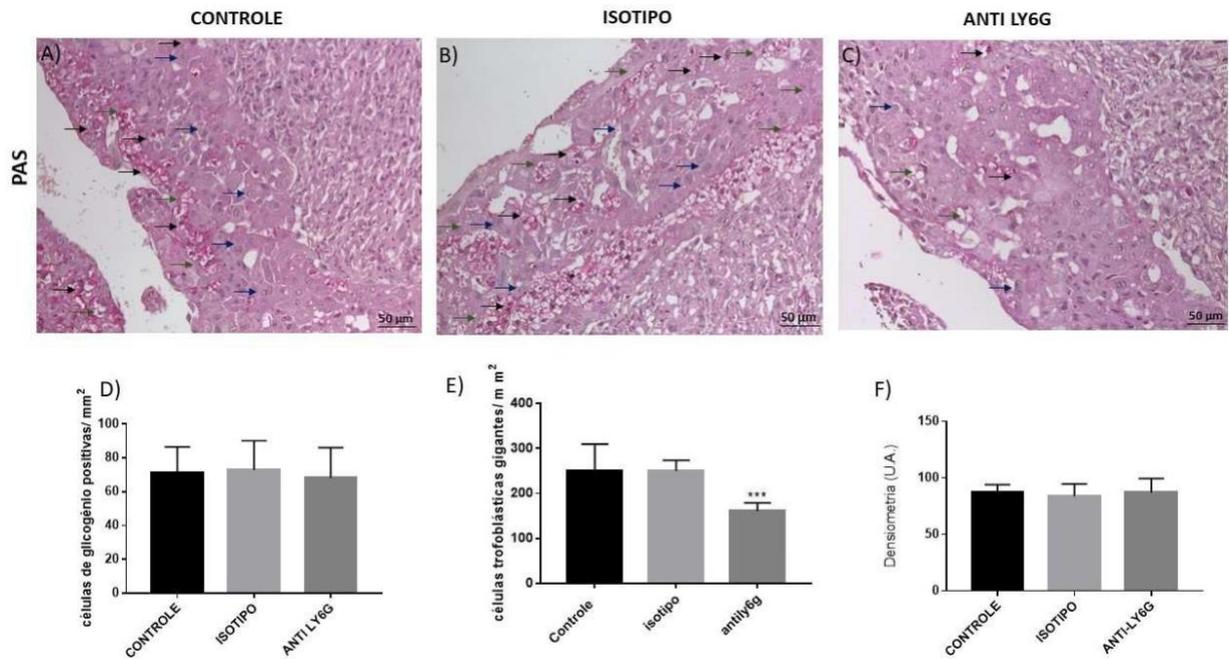
Após a laparotomia das fêmeas C57BL/6 prenhes, a placenta foi coletada para análise histológica por coloração H&E. A análise da placenta foi dividida em 3 compartimentos: decídua basal, juncional e labirinto. As análises histológicas e morfométricas mostraram redução da área da zona juncional da placenta do grupo submetido a depleção neutrofílica em relação aos animais controle. As demais áreas, decídua e labirinto e área total não apresentaram alterações em todos os grupos de animais estudados (**Figura 7**).



**Figura 7:** Imagens da placenta murina dos grupos controle, tratados com isotipo ou anti-Ly6G coradas com H&E (A - C). Aumento de 2,5x. Em destaque estão a Dec- decidua; ZJ- zona juncional e Lb- labirinto. Os gráficos representam as áreas das placentas: área total (D), área da decidua (E), área da zona juncional (F) e área do labirinto (G). Os resultados representam a média  $\pm$  e.p.m. (n=6). \* $p < 0,05$  em relação aos demais grupos. (ANOVA one-way).

#### 5.4 Efeito da depleção de neutrófilos a zona juncional da placenta murina

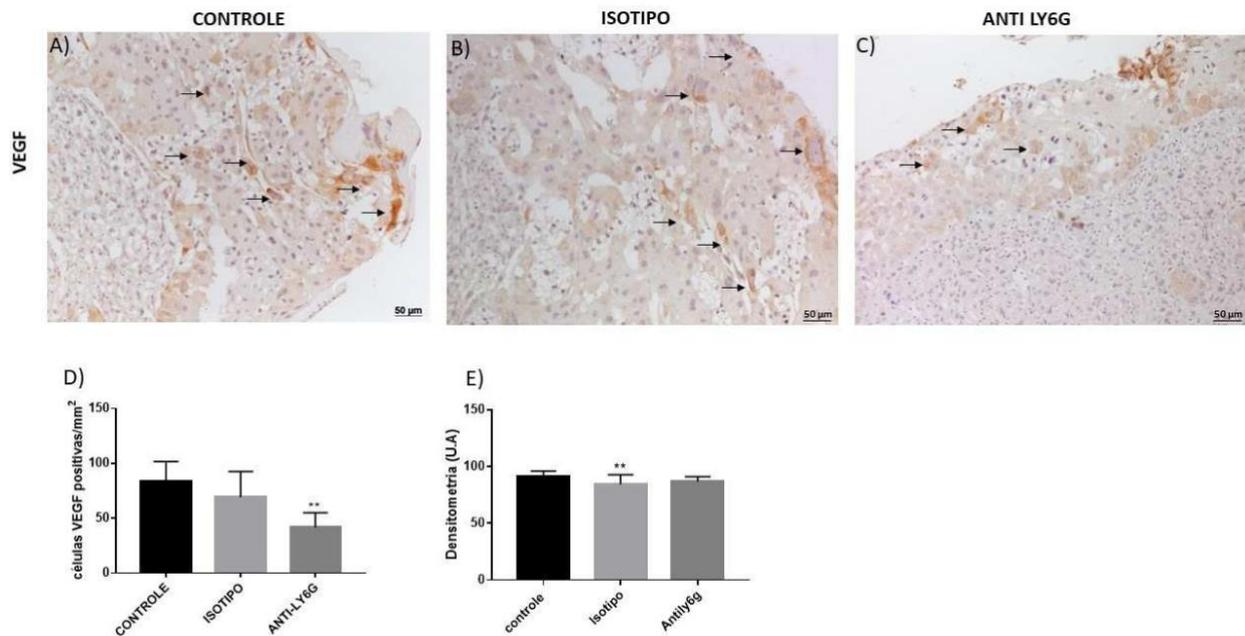
O compartimento juncional é composto de 3 tipos celulares, a saber: espongiotrofoblastos, trofoblastos glicogênio e trofoblastos gigantes. Observou-se pela coloração de PAS uma redução das células trofoblásticas gigantes e alterações morfológicas dos espongiotrofoblastos em placentas obtidas de animais depletados de neutrófilos. Entretanto, nenhuma alteração foi observada nas células de glicogênio positivas e na densitometria da região (Figura 8).



**Figura 8:** Imagens das placentas dos grupos controle, isotipo e anti-Ly6G coradas com PAS. Aumento de 20x (A - C). Contagem das células trofoblásticas gigantes (D) e das células glicogênio positivas (E). Densitometria (F). Setas pretas – células glicogênio positivas. Setas azuis - células trofoblásticas gigantes. Setas verdes - espongiotrofoblastos. Os dados representam a média  $\pm$  e.p.m de (n=6). \*\*\* $p < 0,001$  em relação aos grupos controle e isotipo. (ANOVA one away).

### 5.5 Efeito da depleção neutrofílica sobre células VEGF positivas na placenta

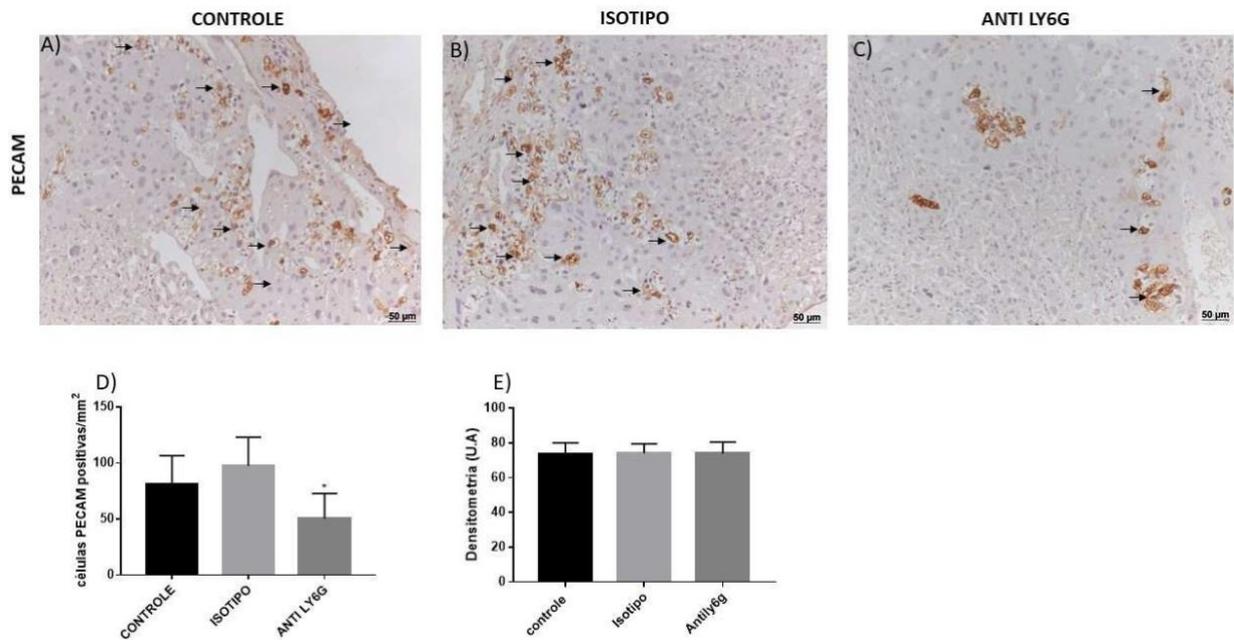
Placentas murinas foram analisadas por imunohistoquímica para marcação de VEGF, fator relacionado à angiogênese. Como foi observado na **Figura 9**, a depleção de neutrófilos promoveu uma redução de células positivas para VEGF na zona juncional.



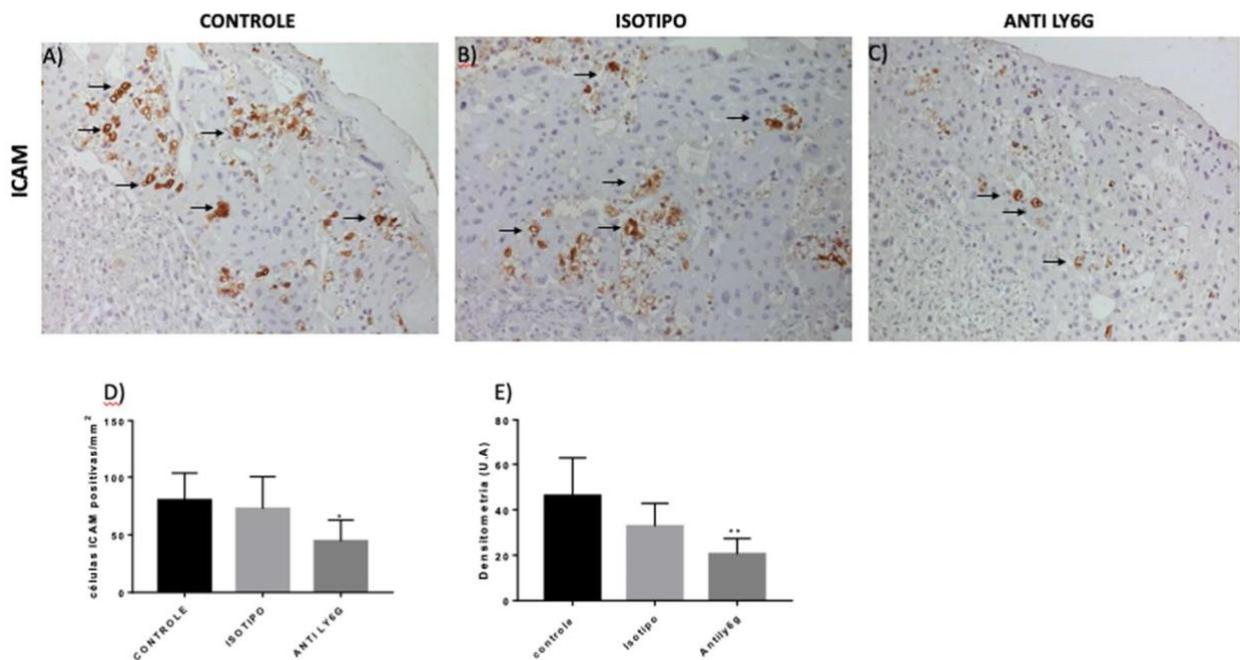
**Figura 9:** Imagens das placentas dos grupos controle, isotipo e anti-Ly6G com marcação para VEGF por imunohistoquímica. Aumento de 20x (A - C). Contagem de células VEGF positivas (D) e análise por densitometria (E) Setas pretas - células positivas. Os gráficos representam a média  $\pm$  e.p.m (n=6). \*\*p<0,01 em relação aos demais grupos de animais. (ANOVA one away).

## 5.6 Efeito da depleção neutrofílica sobre a expressão de moléculas de adesão

Também foi observado a expressão das moléculas de adesão nas placentas. Como observado nas **Figuras 10 e 11**, a marcação de PECAM-1 e ICAM-1 nas placentas dos animais mostrou uma redução de células positivas para estas moléculas de adesão nas células da área juncional em placentas de animais depletados de neutrófilos em relação ao observado nos animais controles.



**Figura 10:** Imagens das placentas dos grupos controle, isotipo e anti-Ly6g com marcação para PECAM-1 por imunohistoquímica (A - C). Aumento de 20x. Contagem para células positivas para PECAM-1 (D) e análise por densitometria (E). Os gráficos representam a média  $\pm$  e.p.m (n=6)\*p<0,05 em relação aos demais grupos de animais. (ANOVA one away).



**Figura 11:** Imagens das placentas dos grupos controle, isotipo e anti-Ly6g com marcação para ICAM por imonohistoquímica (A - C). Aumento de 20x. Contagem para células positivas para ICAM (D) e análise por densitometria (E). Os gráficos representam a média  $\pm$  e.p.m (n=6)\*p<0,05 e \*\*p<0,01 em relação aos demais grupos de animais. (ANOVA one away).

## 6. Discussão

O sucesso da gestão depende de uma diversidade de processos complexos, que vão desde a fertilização do óvulo até o momento do parto. Dentre estes processos, tem sido demonstrado que defeitos na implantação do blastocisto ao epitélio uterino são responsáveis por grande parcela dos insucessos na gravidez (Hemberger *et al.*, 2018), sendo alvo de grande investigação científica (Nadkarni *et al.*, 2016, 2021). Apesar dos estudos sobre o assunto, o controle exercido por células imunes na janela de implantação do blastocisto ainda não é totalmente conhecido, em especial quanto à participação de neutrófilos que migram para o microambiente uterino na janela de implantação. É conhecido que na fase de implantação ocorre um processo inflamatório de baixa intensidade, que é necessário para aumentar a angiogênese e a vasodilatação, que são necessárias para suprir o desenvolvimento do embrião, e para aumentar as propriedades de adesão do epitélio uterino ao blastocisto (Hemberger *et al.*, 2018; Matsumoto, 2017). Sabendo que neutrófilos são células com potencial pró-inflamatório e que secretam mediadores envolvidos na angiogênese e adesão (Ander *et al.*, 2019), nós realizamos a depleção farmacologicamente de neutrófilos circulantes na janela de implantação de camundongos e verificamos que o sucesso da gestação foi prejudicado e os fetos nascidos de cesárea no 18º dia apresentaram comprometimento morfológico (Hebeda *et al.*, em submissão). Por estas razões, nós aqui avaliamos o efeito da depleção neutrofílica na formação da placenta. Pela primeira vez, é mostrado neste trabalho que a ausência de neutrófilos circulantes na fase pré-implantação afeta o desenvolvimento da área juncional da placenta, com redução de células positivas para o VEGF e para moléculas de adesão da família das imunoglobulinas.

A gestação foi induzida pelo acasalamento de camundongos fêmeas C57BL6 com machos Balb/c, que é um modelo animal muito utilizado para estudar tolerância materno-fetal, visto que há uma redução na taxa de insucesso na gestação devido a expansão de células Treg na interface materno-fetal, provocando, conseqüentemente, aumento da tolerância materna e implantação no endométrio (Alijotas-Reig *et al.*, 2014). O procedimento farmacológico para depletar neutrófilos aqui empregado também é bem estabelecido na literatura (Pollenus *et al.*, 2019; Boivin *et al.*, 2020; Stackowicz *et al.*, 2019) sendo que o período de depleção é dependente da concentração de anticorpo empregado. Nós padronizamos o protocolo de tratamento para causar depleção por 48 horas a partir de 24 horas após a detecção do *plug* vaginal, que é indicativo de gestação.

Dados morfológicos da placenta murina evidenciaram as 3 camadas da placenta, decídua materna, juncional e labirinto, bem definidas em todos os grupos de animais. No entanto, a depleção de neutrófilos reduziu a área juncional, onde encontram-se as células trofoblásticas gigantes e o espongiotrofoblasto (Watson & Cross, 2005). De fato, o número de células das células trofoblásticas gigantes estavam reduzidas nos animais depletados de neutrófilos. As células trofoblásticas gigantes exercem função primordial na implantação, pois auxiliam o blastocisto a penetrar no epitélio uterino e implantá-lo no endométrio (Latos *et al.*, 2016). Ademais, as células trofoblásticas gigantes adquirem um fenótipo invasivo, penetrando profundamente no estroma endometrial, quando entram em contato com as artérias maternas para remodelá-las, sendo estas etapas cruciais para o desenvolvimento da placenta (Woods *et al.*, 2018). Os espongiotrofoblasto também tem função estrutural e secretória limitando o crescimento de vasos sanguíneos maternos na placenta fetal (Cross *et al.*, 2002).

Associados, os dados da literatura mostram a importância das células trofoblásticas gigantes para uma invasão trofoblástica e nutrição adequadas do feto, visto que elas auxiliam na interação materno fetal, e nossos dados mostram que neutrófilos maternos são necessários para a perfeita formação das células que compõem a zona juncional. Resultados da literatura corroboram nossos dados, uma vez que alterações na placenta também foram evidenciados em análises de histológicas de camundongos fêmeas C57BL/6 acasaladas com machos Balb C tratadas com anti-Ly6G na fase de tolerância materna, que em camundongos ocorre entre o 5º e 11º dia da gestação (Nadkarni *et al.*, 2016). Mais recentemente foi sugerido que a neutrofilia causada pela administração de nanopartículas de sílica poderia alterar a gestação. No entanto, a depleção de neutrófilos em animais tratados com a nanopartículas causou danos mais acentuados à gestação, detectados por redução no peso materno, no peso uterino, no número de fetos nascidos, lesões na placenta desde a decídua até a camada de espongiotrofoblasto, comprometeu o desenvolvimento de arteríolas espiraladas, reduziu a angiogênese e causou apoptose na placenta. Desta forma, sugeriu-se que, de fato, neutrófilos maternos em condições de homeostasia são necessários para o sucesso da gestação (Higashisaka *et al.*, 2018).

Em humanos, grávidas com pré-eclâmpsia de início precoce apresentam placenta caracterizada por reduzida invasão trofoblástica, o que é associada ao aumento de apoptose e redução da área luminal das artérias fetais. Há controvérsias no que pode

levar a redução da invasão trofoblástica. Alguns estudos indicam que um subconjunto específico de células trofoblásticas responsáveis pelo fenótipo endovascular obliteram inicialmente as artérias espiraladas levando a hipóxia tecidual local resultante de um estímulo à angiogênese, enquanto no restante da parede uterina, as vilosidades coriônicas regridem sob a influência de um suprimento de sangue materno normal para formar o córion. A perda generalizada de trofoblasto endovascular pode levar ao aborto espontâneo por causa de um suprimento sanguíneo materno inadequado para a placenta, enquanto a perda local pode levar a placentas menores com cordões excêntricos (Kadyrov *et al.*, 2006).

Dentre as análises de células trofoblásticas realizadas neste trabalho, foi também determinado o número de células glicogênio positivas pela coloração de PAS. Entretanto, tanto a quantificação de células quanto a análise densitométrica não mostraram diferenças significativas entre os grupos. Uma possível hipótese é que estas células não conseguem utilizar o glicogênio armazenado devido a não migração adequada destas células espongiotrofoblásticas, cuja morfologia apresentava alterações, nas placentas de animais com depleção neutrofílica. Camundongos geneticamente modificados para vias de utilização de glicose, que mimetizam diferentes condições diabéticas, apresentam um aumento de 35% de células de glicogênio na zona juncional. Em alguns destes, embora haja aumento de armazenamento de glicogênio na placenta, as vias de utilização do mesmo encontram-se alteradas, resultando na falha de liberação de nutrientes para o feto, com conseqüente malformações na prole (Tunster *et al.*, 2020).

Associados aos dados da literatura, os resultados obtidos neste trabalho mostram que neutrófilos maternos em condições fisiológicas são fundamentais para a formação da zona juncional da placenta, em especial para a sobrevivência das células trofoblásticas gigantes.

Posterior às análises morfométricas da placenta já descritas, realizamos análises imunohistoquímicas com o uso dos marcadores de superfície, como PECAM-1 e ICAM1 que são marcadores de endotélio, e marcador de fator de crescimento VEGF. Observamos que grande concentração das células positivas para esses marcadores estavam presentes na zona juncional, uma vez que células trofoblásticas secretam VEGF e expressam PECAM-1 e ICAM-1 (Hurt *et al.*, 2017). Entretanto, apesar da marcação ser concentrada nessa área, as placentas de animais com depleção neutrofílica tiveram redução significativa destes marcadores nas células trofoblásticas.

O VEGF é um fator angiogênico encontrado nos neutrófilos, nas células endoteliais e nas células trofoblásticas e atua através da ligação com receptor 2 (VEGFR2) e pelo receptor 1 (VEGFR1 ou tirosina quinase 1 tipo fms-Flt1), sendo este último também expresso pelas células trofoblásticas. O excesso de produção solúvel do Flt1 (sFlt1) durante a gravidez em humanos está associado a complicações graves, incluindo pré-eclâmpsia, uma das principais causas de morbidade e morte materna e fetal. Em camundongos, a super expressão de VEGF está relacionada há uma redução no número de fetos e aumento dos locais de reabsorção, resultando em placentas com defeitos de desenvolvimento. (Fan *et al.*, 2021, Amsalem *et al.*, 2014)

As adesões celulares homotípicas e heterotípicas são fundamentais para a implantação do blastocisto, e deficiências nas interações celulares prejudicam o processo. As adesões celulares mediadas pelas moléculas de superfamília das imunoglobulinas, como a ICAM-1 e PECAM-1, apresentam papéis centrais na resposta imune e na estrutura tecidual, pois são proteínas de membrana ligadas a filamentos de actina e funcionam como indutores da ativação da sinalização intracelular (Yonemura *et al.*, 1999;). Na gravidez, a expressão de ICAM-1 na célula epitelial uterina da membrana apical e nas células internas de formação do trofoblasto é aumentada no momento da implantação, o que parece ser induzido pela secreção de progesterona (Leece *et al.*, 2011; Matsumoto *et al.*, 2004), e também a ICAM-1 está envolvida na manutenção da tolerância materna controlando a secreção de citocinas Th2 (Takeshita *et al.*, 2000). Por ser expresso em células endoteliais, o PECAM-1 está altamente envolvido no processo de angiogênese, e a regulação positiva do PECAM-1 na placenta é esperada, pois novos vasos são necessários para irrigar o feto em crescimento. De fato, PECAM-1 é uma proteína fundamental durante a invasão do citotrofoblasto extraviloso e a transformação das arteríolas em grandes vasos (Zhou *et al.*, 1997), e a falha desses processos leva à pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal (Roberts 1993). Várias evidências apoiam o papel do PECAM-1 nas falhas da gravidez, como: 1) na pré-eclâmpsia, os citotrofoblastos não expressam PECAM-1 (Cho *et al.*, 2021); 2) mães com baixa expressão de PECAM-1 sofrem falhas recorrentes de implantação, em um mecanismo dependente da indução da secreção do fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 pela PECAM-1 (Guo *et al.* 2018), e o comprometimento da expressão de PECAM-1 no blastocisto tem sido apontado como um marcador para transferência assistida de embriões bem-sucedida (Freis *et al.*, 2021). Além disso, PECAM-1 é detectado

precocemente na massa celular interna pluripotente do blastocisto de camundongo, que não contém células vasculares (Robson *et al.*, 2001), apontando que a PECAM-1 possa exercer funções adicionais na implantação do blastocisto além da angiogênese.

## 7. Conclusão

Em conjunto, nossos dados destacam que os neutrófilos maternos são importantes na formação da placenta, em especial das células presentes na zona juncional, sendo que estas são responsáveis pela sustentação e irrigação da placenta. De fato, a ausência de neutrófilos reduziu a frequência de células da zona juncional que expressam VEGF e moléculas de adesão da família das imunoglobulinas. Os mecanismos pelos quais os neutrófilos exercem estes efeitos permanecem por ser esclarecidos, e a compreensão na íntegra de suas ações dependerá de uma grande quantidade de estudos, visto que o neutrófilo é uma célula com grande quantidade de componente granulares que são liberados, além de possuir habilidade de secretar inúmeros mediadores químicos envolvidos na resposta à agressão e no retorno à homeostasia. A vasta ação dos neutrófilos associados à complexidade da implantação do blastocisto deverá ser um campo fértil de estudos científicos, visto a importância aqui demonstrada do neutrófilo materno na janela de implantação.

## Referências Bibliográficas

ALIJOTAS-REIG, J., LIURBA, E., GRIS, J.M., Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: A new challenging role for regulatory T cells. *Placenta*. V.35 p. 241-248 2014.

ALUVIHARE, V. R., KALLIKOURDIS, M., BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology*. V 5. Nº 3 . 2004

AMSALEM, H., KWAN, M., HAZAN, A., ZHANG, R.L., WHITTLE, W., KINGDOM, J. C. P., CROY, B.A., LYE, S.J., DUNK, C.E. Identification of a Novel Neutrophil Population: Proangiogenic Granulocytes in Second-Trimester Human Decidua. *Journal of Immunology*. V.193. 2014.

ANDER, S.E., DIAMOND, M.S., COYNE, C.B. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Science Immunology*. V. 4. Nº 31. 2019.

- BARUT, F., BARUT, A.; GUN, B.D., KANDEMIR, N. O., HARMA, M. I., HARMA, M., AKTUNC, E., OZDAMAR, S.O. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagnostic Pathology*. V.5. Nº 24. 2010.
- BOIVIN, G., Faget, J., Ancy, P. B., Gkasti, A., Mussard, J., Engblom, C., Pfirschke, C., Contat C., Pascual, J., Vazquez, J., Bendriss-Vermare, N., Caux, C., Vozenin, M. C., Pittet, M. J., Gunzer, M., Meylan, E. Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. *Nature Communications*. V. 11. 2020.
- BOURGAIN, C. & DEVROEY, P. Histologic and Functional Aspects of the Endometrium in the Implantatory Phase. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. V. 64, Nº. 3, p.131–133. 2007.
- CALO G., SABBIONE F., PASCUALI N., KEITELMAN I., VOTA D., PAPANINI D., RAMHORTS R., PARBORELL F., TREVANI A., LEIRÓS C. P. Interplay between neutrophils and trophoblast cells conditions trophoblast function and triggers vascular transgformation signals. *Journal Cell Physiology*. V. 235. Nº 4. p. 3592-3603. 2020.
- CHA, J., SUN, X., DEY, S.K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine*. V.18, Nº. 12, p-175-1767. 2013.
- CHEN, X., MAN, G. C. W., WU, F. HUANG, J., LI, T.C, WANG, C.C. Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*. V. 78, Nº. 2, p. 12693. 2017.
- CHO, S., SOHN, Y. D., KIM, S., RAJAKUMAR, A., BADELL, M. L., SIDELL, N., YOON, Y. Reduced angiovasculogenic and incresead inflammatory profiles of cord bloods cells in severe but not mild preeclampsia. *Scientific Reports* . V.11 2021
- CROCKER, I. P., BAKER, P., FLETCHER, J. Neutrophil function in pregnancy and rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Disease*. V. 59, Nº. 7, p. 555-564. 2000.
- CROSS, J. C. & SIMMONS, D. G. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Developmental Biology*. V. 284. Nº. 1. 2005.
- CROSS, J. C. & HU, D. Development and function of trophoblast gigant cells in the rodent placenta. *The International Journal of Development Biology*. V.54. 2010.
- CROSS, J/ C. & ROSSANT, J. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nature Review Genetics*. V.2. 2001.

CRUZ, W. A. S. Atividade de Mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monócitas. São Paulo, 2010. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, 2010. [Orientadora: Ana Campa].

DAIMON, E. & WADA, Y. Role of neutrophils in matrix metalloproteinase activity in the preimplantation mouse uterus. *Biology of Reproduction*. V. 73, Nº. 1, p. 163-171. 2005 .

DAVIDSON, L. M. & COWARD, K. Molecular Mechanisms of Membrane Interaction at Implantation. *Birth Defects Research (Part C)* V. 108, Nº. 1, p.19–32. 2016.

FAN, X., MURUGANANDAN, S., SHALLIE D. P., DHAL, S., PETITT, M., NAYAK, N.R., VEGF Maintains Maternal Vascular Space Homeostasis in the Mouse Placenta through Modulation of Trophoblast Giant Cell Functions. *Biomolecules*. V. 11, Nº.7. 2021.

FAZLEABAS, A. & STRAKOVA, Z. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Molecular and Cellular Endocrinology*. V. 186, Nº. 2, p. 143-147. 2002.

FRIDLENDER, Z., SUN, J., KIM, S., KAPOOR, V., CHENG, G., LING, L., WORTHEN, G.S., ALBELDA, S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell Article*. V. 16, Nº. 3, p. 183-94. 2009.

GARCÍA-CULEBRAS A., DURÁNOLAFOR V., PEÑA-MARTÍNEZ C., MORAGA A., BALLESTEROS I., CUARTERO M. I., DE LA PARRA J., PALMA-TORTOSA S., HIDALGO A., CORBÍ A. L., MORO M.A., LIZASOAIN I., Role off TLR4 (Toll-Like Receptor 4) in N1/N2 Neutrophil Programming After Stroke. *AHA Journals*. V. 50. p.2922-2932. 2019.

GRIFFITHS, S.K. & CAMPBELL, J.P. Placental structure, function and drug. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*. V.15. Nº. 2. P. 84-89. 2015.

GREER, J.P., ARBER, D.A., GLADER, B., LIST, A.F., JR, R.T.M, PARASKEVAS, F., RODGERS, G.M. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 11º Edição, 2004.

GOLDMAN-WOHL, D. & YAGEL, S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Molecular and Cellular Endocrinology*. V. 187. Nº.1. P. 233-238. 2002

GUO, F., SI, C., ZHOU, M., WANG, J., ZHANG, D., LEUNG, P.C.K, XU, B., ZHANG A. Decreased PECAM-1 mediated TGF- $\beta$ 1 expression in the mid-secretory endometrium in women with recurrent implantation failure. *Human Reproduction*. V.33.2018

HARJUNPÄÄ, H., ASENS, M. L., GUENTHER, C., FAGERHOLM, S.C. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Frontier Immunology*. 2019.

HANTAK, A. M., BAGCHI, I.C., BAGCHI, M.K. Role of Uterine Stromal-Epithelial Crosstalk in Embryo Implantation. *International Journal of Developmental Biology*. V.58, p.139–146. 2014.

HEMBERGER, M.; HANNA, C.W.; DEAN, W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nature Reviews Genetics*. V. 21, p. 27-43. 2020.

HEMBERGER, M; WOODS, L.; GARCÍA-PÉREZ, V. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth- New Insights from Mouse Models. *Frontiers in Endocrinology*. V. 9, N° 570. 2018.

HERATH, T. D. K., LARBI, A., TEOH, S.H., KIRPATRICK, C.J., GOH, B.T. Neutrophil-mediated enhancement of angiogenesis and osteogenesis in a novel triple cell co-culture model with endothelial cells and osteoblasts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. V.12, N° 2, p.1221-1236. 2018.

HIGASHISAKA K., NAKASHIMA A., IWAHARA Y., AOKI A., NAKAYAMA M., YANAGIHARA I., LIN Y., NAGANO K., TSUNODA S., SAITO S., YOSHIOKA Y., TSUTSUMI Y., Neutrophil Depletion Exacerbates Pregnancy Complications, Including Placental Damage, Induced by Silica Nanoparticles in Mice. *Front. Immunol*. 2018.

HUANG, N., CHI, H., QIAO, J. Role of Regulatory T Cells in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Healthy Pregnancies and Reproductive Diseases. *Frontiers Immunology*. V. 11. 2020

HURT, B., SCHULICK, R., EDIL, B., EL KASEMI, C., BARNETT, C. Cancer-promoting mechanisms of tumor-associated neutrophils. *The American Journal of Surgery*. V.214. 2017

HUHN. O., ZHAO, X., ESPOSITO, L., MOFFETT, A., COLUCCI, F., SHARKEY, S. M. How do Uterine Natural Killer and Innate Lymphoid Cells Contribute to Successful Pregnancy? *Frontiers Immunology*. V12. 2021

ISAAC, S. M., LANGFORD, M. B., SIMMONS, D. G., & ADAMSON, S. L. Anatomy of the Mouse Placenta Throughout Gestation. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, V.4, p. 69–73. 2014.

KADYROV M., KINGDOM J. C. P., HUPPERTZ B., Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* V.194. p. 557–63. 2006.

KARIZBODAGH, M.P., RASHIDI, B., SAHEBKAR, A., MASOUDIFAR, A., MIRZAEI, H. Implantation Window and Angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. V. 12, N<sup>o</sup>. 2, p. 4141-4151. 2017.

KIM, S. & KIM, J. A Review of Mechanisms of Implantation. *Development & Reproduction*. V. 21, N<sup>o</sup>. 4, p.351-359. 2017.

LEECE, L., Kaneko, Y., MADAWALA, R. J., MURPHY, C.R. ICAM1 and fibrinogen- $\gamma$  are increased in uterine epithelial cells at the time of implantation in rats. *Molecular Reproduction and Development*. V.78. 2011

LI, G., XU, C., LIN, X., QU, L., XIA, D., HONGDU, B., XIA, Y., WANG, X., LOU, Y. HE, Q., MA, D., CHEN, Y. Deletion of *Pdcd5* in mice led to deficiency of placenta development and embryonic lethality. *Cell Death & Disease*. V.8. N<sup>o</sup>.5. 2017.

LOPEZ, N. G., LOUIS, D.M LEHR, M. A., RODRIGUEZ, E. N., HERNANDEZ, M. Immune cells in term and preterm labor. *Cellular and Molecular Immunology*. V 11. N<sup>o</sup>.6. 2014.

LWEIS, R.M., CLEAL J.K. *The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease*, 2016.

MATSUMOTO, H. Molecular and cellular events during blastocyst implantation in the receptive uterus: clues from mouse models. *Journal of Reproduction and Development*. V. 63. N<sup>o</sup>.5. 2017.

MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.N., TORCHIA, M.G. *Embriologia básica*. 8<sup>o</sup> Edição, 2013.  
MULLER, N. The Role of Intercellular Adhesion Molecule-1 in the Pathogenesis of Psychiatric Disorders. *Frontier Pharmacology*. V. 22. 2019.

NADKARNI, S., SIMTH, J., SFERRUZZI-PERRI, A.N., LEDWOZYW, A., KISHORE, M., HAAS, R., MAURO, C., WILLIAMS, D.J., FARSKY, S.H., MARELLI-BERG, F.M, PERRETTI, M. Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 113, N<sup>o</sup>. 56, p. 8415-8424. 2016.

NADKARNI, S., BERT, S., WARD, E.J. Neutrophils in pregnancy: New insights into innate and adaptive immune regulation. *Immunology*. V. 164. N<sup>o</sup> 4. 2021

NADKARNI, S., WARD, E. J., BERT, S. Neutrophils in pregnancy: New insights into innate and adaptive immune regulation. *Immunology*. V. 164. N<sup>o</sup>. 4. 2021.

NEJABATI, H.R., LATIFI, Z., GHASEMNEJAD, T., FATTAHI, A., NOURI, M. Placental growth factor (PLGF) as an angiogenic/inflammatory switcher: lesson from early pregnancy losses. *Journal Gynecological Endocrinology*. V. 33, N<sup>o</sup>. 9, p. 668-674. 2017.

NEWMAN, P. J., HU, H., MEI, H., LIAO, D., LERTKIATMONGKOL, P. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr Opin Dermatol.* V.23. N<sup>o</sup>. 3. 2016.

NORWITZ, E. R., SCHUST, D.J., FISHER, S.J Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine.* V. 345, N<sup>o</sup>. 19, p 1400-1408. 2001.

PICCARD, H., MUSCHEL, R.J., OPDENAKKER, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Critical Review in Oncology Hematology.* V. 82, N<sup>o</sup>. 3, p. 296-309. 2012.

POLLENUS, E., MALENGIER-DVLIES, B., VANDERMOSTEN, L., PHAM, T.T., MITERA, T., POSSEMIERS, H., Boon, L., OPDENAKKER, G., MATTHYS, P., VAN DEN STENEN, P. E. Limitations of Neutrophil depletion by anti-Ly6G antibodies in two heterogenic immunological models. *Immunology Letters,* V. 212. P. 30-36. 2019.

PRAMANIK, S.S., PRAMANIK, T., MONDAL, S.C., CHANDA, R. Number, maturity and phagocytic activity of neutrophils in the three trimesters of pregnancy. *La Revue de Santé de la Méditerrané Orientale.* V. 13, N<sup>o</sup>. 4, p 862-867. 2007.

ROBERTS, J.M., REDMAN, C. W. G. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet.* V 341. 1993.

ROBSON, P., STEIN, P., ZHOU, B., SCHULTZ, R. M., BALDWIN, H.S. Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. *Development Biology.* V.234. 2001

ROCCA, C., CARBONE, F., LONGOBARDI, S., MATARESE, G. The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunology Letters.* V. 162. N<sup>o</sup>.1. 2014.

SAITO, S., NAKASHIMA, A., SHIMA, T., ITO, M. REVIEW ARTICLE: Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology.* V 62. N<sup>o</sup>. 6. 2010.

SANDRI, S., HEBEDA, C.B., LOIOLA, R.A., CALGAROTO, S., UCHIVAMA, M.K., ARAKI, K., FRANK, L.A., PAESE, K., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R., FARSKY, S.H.P. Direct effects off poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules on human immune cells. *Nanomedicine (Lond.).* V.14, p. 1429–1442. 2019.

SHARKEY, A.M. & MACKLON, N.S. The science of implantation emerges blinking into the light. *Reproductive Biomedicine Online.* V. 27, N<sup>o</sup>. 5, p. 453-460. 2013.

SIONOV, R.V., FRIDLENDER, Z.G., GRANOT, Z. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment*. V. 8, N<sup>o</sup>. 3, p125-158. 2014.

SOARES, M. J., Varberg, K. M., Iqbal, K. Hemochorial placentation: development, function and adaptations. *Biological Reproduction*. V. 99, N<sup>o</sup>. 1, p196-211. 2018

SOKOLOV, D. I., LYOYA, T.Y., OKOROKOYA, L.S., SHEVELEVA, A.R., STEPANOVA, O.I., MIKAILOVA, V.A., SEL'KOV, S.A. Effect of Cytokines on the Formation Tube-Like Structures by Endothelial Cells in the Presence of Trophoblast Cells. *Kletochnye Tekhnologii v Biologii i Meditsine*. V.163, N<sup>o</sup>. 1, p. 39-50. 2016.

STACKOWICZ, J., JÖNSSON, F. REBER, L. L. Mouse models and tools for the invivo study of neutrophils. *Frontiers in Immunology*. V. 10. 2019.

TUNSTER, S. J., WATSON, E. D., FOWDEN, A. L., BURTON, G. J. Placental glycogen stores and fetal growth: insights from genetic mouse models. *Reproduction Review*. 2020.

VAN DEL BRÛLE, F., BERNDT, S., SIMON, N., COULON, C., GOARANT, J., MUNUAT C., NOËL, A., FRANKENNE, F., FOIDART, J. M. Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Immunology Allergy*. V 88. P.163-180. 2005.

XIAO, J., GARCIA-LIORET, M., WINKLER-LOWEN, B., MILLER, R., SIMPSON, K., GUILBERT, L. J., ICAM-1 mediated Adhesion of Peripheral Blood Monocytes to the Maternal Surface of Placental Syncytiotrophoblasts. *American Journal of Pathology*. V. 130. N<sup>o</sup> 5. 1997

XU, B., CHEN, X., DING, Y., CHEN, C., LIU, T., ZHANG H. Abnormal angiogenesis of placenta in progranulin-deficient mice. *Molecular Medicine Reports*. V. 22 N<sup>o</sup>.4. 2020  
WANG, H. & DEY, S.K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*. V.7, N<sup>o</sup>. 3, p.185-99. 2006.

WEIMAR, C., POST UITERWEER, E.D., TEKLENBURG, G., HEIJNEN, C.J., MACKLON, N.S. In-vitro model systems for the study of human embryo-endometrium interaction. *Reproductive Biomedicine*. V. 27, N<sup>o</sup>. 5, p. 461-476. 2013.

YONEMURA, S., ANDO-AKATSUKA, Y., Itoh, M., Furuse, M. Tsukita, S. Differential behavior of E-Cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity. *Journal Cell Physiology*. V. 179. N<sup>o</sup>.2 1999.

ZENCLUSSEN, A.C. & HAMMERLING, G.J. Cellular Regulation of the Uterine Microenvironment That Enables Embryo Implantation. *Frontiers in Immunology* V.17, p 321. 2015.

ZHI, H., KANAJI, T., FU, G., NEWMAN, D. NEWMAN, P.J. Generation of PECAM-1 (CD31) Conditional Knockout Mice. Genesis Author manuscri.V. 58. Nº. 2. 2020

ZHOU, Y., FISHER, S. J., JANATPOUR, M., GENBACEV O., DEJANA, E., WHEELLOCK, M., DAMSKY, C. H. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?. The Journal of Clinical Investigation. 1997.

## **ANEXOS**

# HISTÓRICO ESCOLAR - SISTEMA JANUS

12/06/2022 19:38

**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**FICHA DO ALUNO**

**9136 - 11599207/1 - Anna Carolina Savioli**

**Email:** annacsavioli@usp.br  
**Data de Nascimento:** 21/09/1993  
**Cédula de Identidade:** RG - 41.457.021-2 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Farmacêutica Bioquímica - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Araraquara - São Paulo - Brasil - 2019

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
**Área:** Análises Clínicas  
**Data de Matrícula:** 13/01/2020  
**Início da Contagem de Prazo:** 13/01/2020  
**Data Limite para o Depósito:** 13/07/2022  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 13/01/2020 até o presente. Email: sfarsky@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, 13/01/2020  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 02/06/2021  
**Data do Depósito do Trabalho:**  
**Título do Trabalho:**  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:**  
**Data de Aprovação da Banca:**  
**Data Máxima para Defesa:**  
**Data da Defesa:**  
**Resultado da Defesa:**  
**Histórico de Ocorrências:** Primeira Matrícula em 13/01/2020

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 21/03/2022

**Impresso em:** 12/06/2022 19:31:32

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**FICHA DO ALUNO**

9136 - 11599207/1 - Anna Carolina Savioli

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-14/3	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	10/03/2020	23/06/2020	15	1	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/9	Aprimoramento Pedagógico	17/03/2020	13/04/2020	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5959-1/1	Desenvolvendo sua comunicação científica no mundo acadêmico	19/03/2020	29/04/2020	90	6	100	A	N	Concluída
ICB5744-2/2	Fisiopatologia do Inflamassoma: The Good, The Bad and The Ugly (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	11/05/2020	24/05/2020	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5722-5/3	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	11/05/2020	31/05/2020	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5805-3/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/08/2020	19/10/2020	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/5	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	14/08/2020	26/11/2020	15	1	100	A	N	Concluída
FCF5001-1/1	Seminários Gerais em Ciências Farmacêuticas	01/09/2020	14/12/2020	30	2	100	A	N	Concluída
MPT5760-5/5	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	13/10/2020	14/12/2020	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	26
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/03/2022

Impresso em: 12/06/2022 19:31:32

# Currículo Lattes

Currículo Lattes

26/03/2021 10:11



## Anna Carolina Savioli

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5461342233999846>

Última atualização do currículo em 26/03/2021

### Resumo informado pelo autor

Possui graduação em FARMÁCIA BIOQUÍMICA pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2019). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Cosmetologia. Está cursando MESTRADO em Farmácia (Fisiopatologia e Análises Clínicas) da Universidade de São Paulo com ênfase em Bases Fisiopatológicas da Doença e Inflamação

(Texto informado pelo autor )

### Nome civil

**Nome** Anna Carolina Savioli

### Dados pessoais

**Nascimento** 21/09/1993 - Brasil

**CPF** 385.708.648-33

### Formação acadêmica/titulação

**2020** Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Participação dos neutrófilos na implantação do blastocisto em camundongos  
Orientador: Sandra H. P. Farsky  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**2012 - 2019** Graduação em FARMÁCIA BIOQUÍMICA.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
Título: LINHA INTENSE CAPILAR, Ano de obtenção: 2019  
Orientador: MARCOS ANTÔNIO CORRÊA

### Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

#### Vínculo institucional

**2013 - 2016** Vínculo: ESTÁGIO , Enquadramento funcional: estágio , Carga horária: 8, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Estágio em desenvolvimento de formulações cosméticas no Laboratório de Cosmetologia (LaCos) pertencente ao Departamento de Farmácias e Medicamentos da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho campus de Araraquara, sob orientação do professor Dr. Marcos Antônio Corrêa.

2. Siemens Healthineers - SH

#### Vínculo institucional

**2017 - 2018** Vínculo: estágio , Enquadramento funcional: estágio , Carga horária: 30, Regime: Parcial  
Outras informações:  
estágio na área de Customer Education Service na empresa de soluções médicas Siemens Healthineers, onde atuei no projeto de desenvolvimento de indicadores pela plataforma SAS, acompanhei treinamentos e visitas em cliente, atuei no controle de documentação da área, e atuei no projeto Atellica Solution.

### Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

#### Orientações e supervisões concluídas