

## **Expresión de receptores de quimiocinas (CXCR-4 y CCR-5) en placenta humana normal a término.**

*Suhjeys Bustamante, Yanell García, Heidi Garrido, Sara Bethencourt, Robert Toxar, Loida Ponce, José Corado y Sioly Mora-Orta*

Unidad de Investigaciones en Inmunología (UNIVENIN), Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. Correo electrónico: siolyorta1@yahoo.com

**Palabras clave:** Quimiocinas, CCR-5, CXCR-4, placenta

**Resumen.** La interfase materno-fetal posee un Sistema Inmunitario (SI) activo cuyos mediadores –células, citocinas y quimiocinas–, intervienen coordinadamente para favorecer el desarrollo normal del embarazo. No se conoce con exactitud cuales de esos mediadores están presentes en cada estrato celular de la placenta y cuales pueden ser las consecuencias fisiológicas o potencialmente patológicas derivadas de su presencia. Se sabe que las quimiocinas reclutan hacia la decidua células con actividad reguladora y algunos de sus receptores son correceptores para agentes infecciosos como el VIH, por lo que en los últimos años ha cobrado gran interés investigar la expresión de quimiocinas y sus receptores en la interfase materno-fetal. En el presente trabajo se investigó la expresión de los receptores de quimiocinas (CXCR-4 y CCR-5) en 8 muestras de placenta humana normal obtenidas de embarazos a término, de bajo riesgo obstétrico, utilizando técnicas de Inmunocitoquímica (Biotina-Avidina-Peroxidasa). El hallazgo más relevante de este estudio es la demostración de la expresión diferencial de CXCR-4 y de CCR-5 en trofoblasto, estroma y endotelio, y representa, hasta donde conocemos, el primer reporte de la presencia de estos receptores en todas las capas del tejido placentario. Estos resultados contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la expresión de receptores de quimiocinas –que actúan como correceptores fundamentales en la infección por VIH–, en la interfase materno-fetal, y puede ser un aporte a ser tomado en cuenta en el estudio de la transmisión vertical de ese agente infeccioso.

**CXCR-4 AND CCR-5 expression in normal term human placenta.***Invest Clín 2004; 46(1): 25 - 35***Key words:** Chemokines, CCR-5, CXCR-4, placenta

**Abstract.** The maternal-fetal interphase has an active Immunitary System (IS) whose mediators –cells, cytokines and chemokines– coordinately act to favour pregnancy normal development. It is not known exactly which of those mediators are present in each placental cellular stratus and what the physiological or potentially pathologic consequences derived from their presence can be. It is known that chemokines recruit cells with regulatory activity towards the deciduous and some of their receptors are coreceptors to infectious agents like HIV, making research of chemokines expression and their receptors in the maternal-fetal interphase of great interest in recent years. In the present study, the CXCR-4 and CCR-5 expression was investigated in 8 samples of normal human placenta obtained from term pregnancies, with low obstetric risk, by using Immunocitochemical techniques (Biotin-Avidin-Peroxidase). The most relevant finding in this study was the demonstration that CXCR-4 and CCR-5 differential expression in trophoblast, stroma and endothelium represents, as far as we know, the first report of the presence of these receptors in all layers of placental tissue. These results help to broaden the knowledge about the expression of chemokines receptors –that act as main coreceptors in the HIV infection– in the maternal-fetal interphase, and this can be a contribution to be taken into account in the vertical transmission study of this infectious agent.

*Recibido: 30-09-2003 Aceptado: 09-09-2004.*

**INTRODUCCIÓN**

En lo que concierne a la reproducción humana, el Sistema Inmunitario (SI), sistémico y endometrial, ejerce varias funciones de gran importancia. En primer lugar, contribuye con todos los aspectos de la evolución fisiológica del embarazo, como la implantación, la tolerancia fetal y el trabajo de parto (1). En segundo lugar, interviene en la defensa frente a agentes infecciosos que pueden atacar la interfase materno-fetal, y en tercer lugar, persigue evitar el rechazo del alotrasplante fetal (2, 3). En la respuesta inmunitaria (RI) local participan los tejidos maternos y los fetales. En ella intervienen los linfocitos T, las células NK, los

macrófagos, las citocinas y el trofoblasto (4, 5). En los últimos años se ha enfocado la atención sobre el papel que juegan las citocinas y quimiocinas como mediadoras de la evolución fisiológica del embarazo, así como, en la finalización del embarazo a término y pre-término (6 -10). En particular, las quimiocinas están implicadas en el reclutamiento de células NK, linfocitos T y macrófagos, todas de gran importancia en la fisiología de la interfase materno-fetal, además se ha reportado que la decidua produce numerosas quimiocinas y expresa sus correspondientes receptores, por lo que se piensa que estas moléculas pueden jugar un importante papel en el desarrollo normal del embarazo (11).

Los receptores de las quimiocinas son una gran familia de proteínas transmembrana, que poseen 7 dominios, se acoplan a la proteína G y se expresan en diversas células linfoides y no linfoides. Los linfocitos T, B, NK, las células dendríticas, las células accesorias del SI, las células epiteliales y endoteliales, y las células nerviosas, poseen diferentes tipos de receptores de quimiocinas (12). Esta clase de receptores se caracteriza por establecer enlaces tanto específicos como promiscuos con las moléculas de unión (13). CCR-5 es un receptor de  $\beta$ -quimiocinas que interactúa con MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4) y RANTES (CCL5), e interviene, principalmente, en el reclutamiento de monocitos, linfocitos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos y células NK, mientras que, CXCR-4 es un receptor de  $\alpha$ -quimiocinas, menos promiscuo que el anterior, ya que interactúa casi exclusivamente con SDF-1 $\alpha/\beta$  (CXCL12) (14-16). La unión de CXCR-4 con su receptor favorece el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos T y B, y células dendríticas. Además, se ha reportado que esta unión cumple un importante papel en la hematopoyesis, organogénesis, vascularización y embriogénesis (17). CCR-5 y CXCR-4, junto con otros receptores de quimiocinas como CCR-2 y CCR-3 son correceptores para el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (18, 19).

Existen numerosos estudios sobre la expresión basal de CCR-5 y CXCR-4, tanto en células placentarias normales como en el contexto de la transmisión vertical del VIH y otras patologías infecciosas. Estos reportes son muy controversiales (20-33).

En el presente trabajo, se estudió el patrón de expresión de los receptores CCR-5 y CXCR-4 en tejido placentario humano normal, obtenido de mujeres con embarazo a término de bajo riesgo obstétrico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Previo consentimiento informado, se procesaron 8 placentas provenientes de mujeres con embarazo a término, de bajo riesgo obstétrico de acuerdo con su control pre-natal. De cada placenta se obtuvo una muestra (cotiledón), la cual fue fijada en una solución de formaldehído en Buffer Fosfato Salino (PBS) al 10% (pH 7,4) y posteriormente incluida en parafina.

Los bloques de tejido parafinado fueron cortados en secciones de 5  $\mu$ m. Las secciones fueron colocadas en láminas porta objeto pre-tratadas con poli-L-lisina (PLL) a una dilución 1:10. El procedimiento inmunohistoquímico fue realizado según el método de la Biotina-Avidina-Peroxidasa (Vector Lab. U.S.A.). Las secciones previamente parafinadas y fijadas en formalina fueron desparafinadas con xilol, y luego rehidratadas y lavadas con PBS. Después de bloquear la actividad endógena de la peroxidasa con metanol-peróxido al 3% durante 5 minutos y los sitios de enlace de las proteínas con suero de caballo normal durante 40 minutos, la muestra de tejido fue incubada por 40 minutos con los anticuerpos primarios: anti-CCR-5 y anti-CXCR-4 humanos (R & D Systems, U.S.A.), diluidos en PBS pH 7,4, para alcanzar concentraciones de 10  $\mu$ g/mL y 20  $\mu$ g/mL, respectivamente.

Después de lavar con PBS, las secciones de tejido fueron incubadas, a temperatura ambiente, durante 40 minutos con 50  $\mu$ g/mL del anticuerpo conjugado a biotina, anti-IgG de ratón (Vector Lab. U.S.A.).

Los sitios de actividad de la peroxidasa fueron visualizados después de incubar por 4 minutos con el cromógeno Novared (Vector Lab. U.S.A.). Las secciones de tejido fueron coloreadas con Hematoxilina Eosina Gill's (Vector Lab. U.S.A) durante 5 minutos, lavadas y secadas. Finalmente, las sec-

ciones de tejido fueron cubiertas con el medio de inclusión rápida para microscopía (Entellan) (Merck, KGaA. Alemania) antes de la colocación del cubreobjeto.

Los controles negativos fueron preparados de la misma forma, pero reemplazando el anticuerpo primario con un anticuerpo irrelevante.

Para el análisis de las imágenes microscópicas se estableció previamente un patrón con los siguientes aspectos: 1. Se consideró positiva la expresión de CXCR-4 o CCR-5 cuando el tejido tomó una coloración pardo-rojiza o pardo-violácea producto de la reacción de óxido reducción experimentada por el cromógeno, en el sitio de unión del anticuerpo primario con el antígeno (CXCR-4 o CCR-5 según al caso) 2. Se consideró negativa la expresión cuando el tejido tomó una coloración violácea. Esta apreciación se llevó a una escala ordinal para expresar la intensidad de la reacción, tanto global como por capas (trofoblasto, estroma y endotelio), de la siguiente manera:

- Reacción negativa (-)
- Reacción positiva, intensidad débil (+)
- Reacción positiva, intensidad moderada (++)

- Reacción positiva, intensidad fuerte (+++)

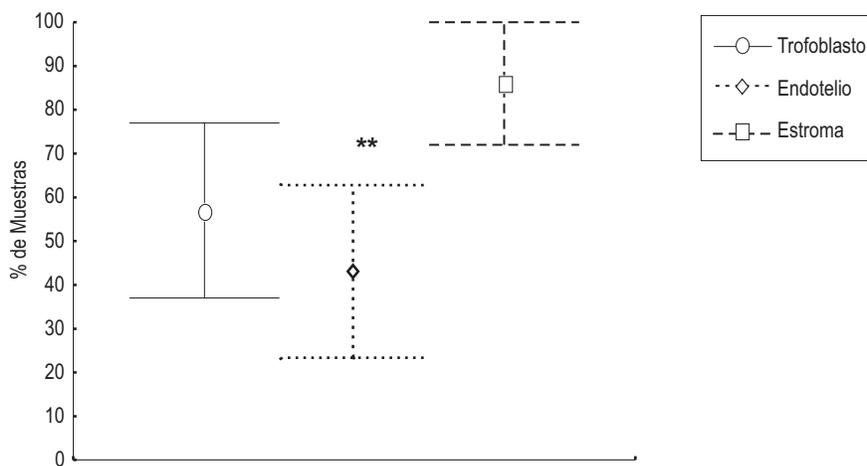
Las láminas fueron procesadas el mismo día para ambos anticuerpos, y la observación y análisis de los cortes fue realizado por tres miembros del personal del laboratorio de manera independiente.

#### Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados en frecuencias relativas (%)  $\pm$  Error Estándar (EE), según localización e intensidad del marcaje analizado. Se aplicó la Prueba Z para comparar las diferencias entre los porcentajes (%) obtenidos, considerándose significativos valores de  $P < 0,05$

### RESULTADOS

En la Fig. 1 se observa que CCR-5 se expresó en  $86 \pm 14\%$  de los casos en el estroma;  $57 \pm 14\%$  de los casos en el trofoblasto y  $43 \pm 20\%$  de los casos en endotelio. La comparación de los porcentajes de expresión entre las diferentes capas muestra que, en el estroma, la frecuencia relativa de expresión fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor a la observada en endotelio. No se observaron diferencias significativas al com-



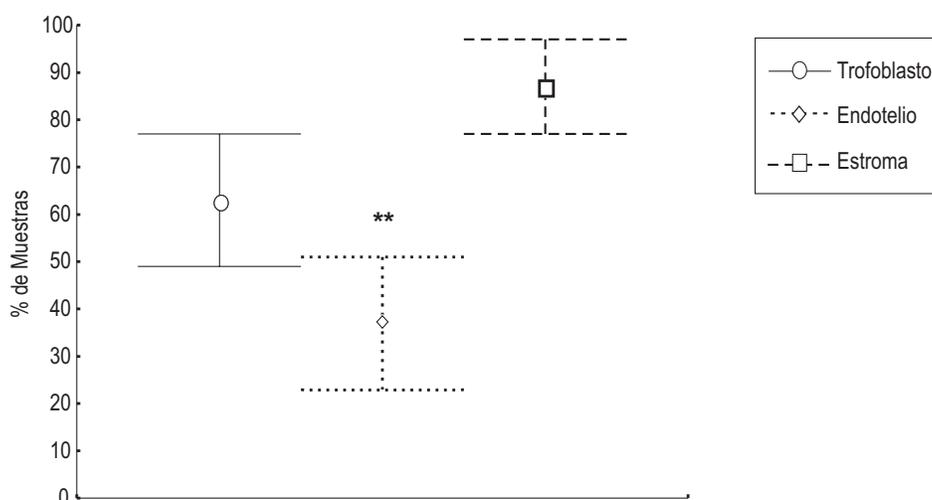
\*\*Endotelio vs Estroma  $p < 0,05$

Fig. 1. Frecuencia relativa de expresión de CCR-5 en placenta humana.

rar la frecuencia relativa de expresión entre trofoblasto y estroma así como entre trofoblasto y endotelio.

La Fig. 2 muestra que CXCR-4 se expresó en estroma en  $87 \pm 10\%$  de los casos;  $63 \pm 14\%$  en trofoblasto y  $37 \pm 14\%$  en endotelio. Este porcentaje de expresión fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en estroma que en endotelio y similar, desde el punto de vista estadístico ( $P > 0,05$ ), cuando se comparó la expresión en trofoblasto con endotelio y estroma.

La intensidad de la expresión fue variable para ambos receptores. En el caso de CCR-5 (Fig. 3) fue de débil a moderada en trofoblasto (43 y 14%, respectivamente) y estroma (57 y 29%, respectivamente) y débil (42%) en endotelio. La intensidad de expresión de CXCR-4 (Fig. 4) fue también muy variable. En estroma, en 25% de casos la expresión fue débil, 37% moderada y en 25% de fuerte intensidad. En trofoblasto la expresión fue de 12,5 % de manera fuerte y débil y en 38% de los casos de manera mo-



\*\*Endotelio vs Estroma  $p < 0,05$

Fig. 2. Frecuencia relativa de expresión de CXCR-4 en placenta humana.

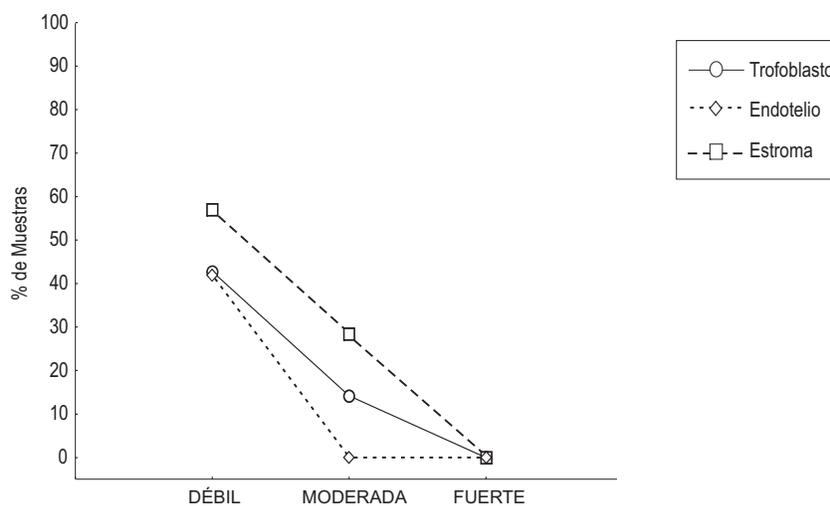


Fig. 3. Intensidad de expresión de CCR-5 en placenta humana.

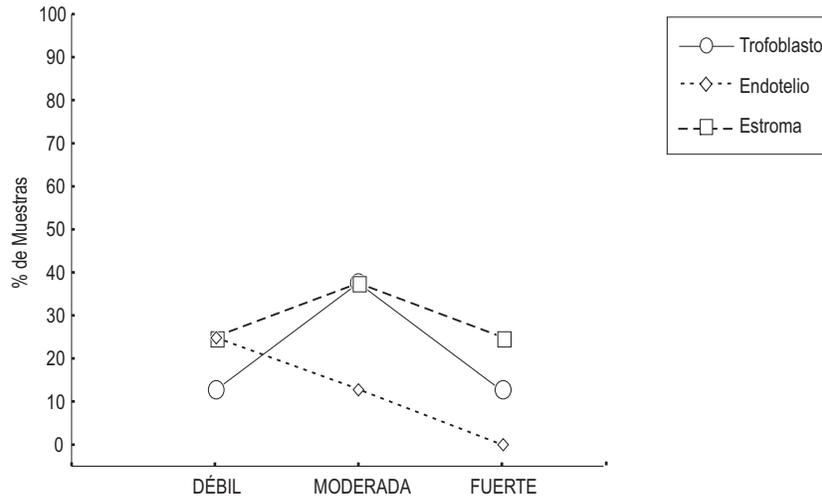


Fig. 4. Intensidad de expresión de CXCR-4 en placenta humana.

derada, mientras que, en el endotelio fue débil en 25% de los casos y 12% moderada. La Fig. 5 muestra la coloración pardo-rojiza correspondiente a CCR-5 y la intensidad de esa expresión en trofoblasto. La Fig. 6 muestra la tinción violeta típica de un control negativo. En las Figs. 7 y 8 se muestra la expresión de CXCR-4, en color pardo-rojizo, en las diferentes capas de la placenta.

## DISCUSIÓN

Las quimiocinas, por su propia naturaleza, intervienen en el reclutamiento selectivo de células que cumplen una función clave en el embarazo, pero, además, ejercen funciones en la diferenciación del citotrofoblasto en la embriogénesis y en la angiogénesis (9, 10, 26-28). El efecto de estos mediadores se cumple a través de la interacción con sus receptores. Algunos de ellos, tales como CXCR-4 y CCR-5 actúan como correceptores del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (18, 19). El reporte de estos hallazgos ha generado gran interés en investigar los patrones de expresión de los receptores de quimiocinas CXCR-4 y CCR-5, en tejido placentario, en la búsqueda de una mejor comprensión de los mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria en la interfase

materno-fetal y de la transmisión vertical de la infección por VIH (30-32).

En este trabajo, se muestra que CCR-5 y CXCR-4 están presentes en trofoblasto, estroma y células endoteliales de placentas provenientes de mujeres con embarazo a término y bajo riesgo obstétrico. Esta expresión es significativamente mayor en estroma que en endotelio, para ambos receptores. Encontrándose, además, una intensidad de expresión variable.

Estos resultados, concuerdan con los de diferentes autores en cuanto a la expresión de CXCR-4 en trofoblasto placentario normal (20,21). Sin embargo, Bebbahani y col. (21) no encontraron expresión de este receptor en esa capa de la placenta. Por otro lado, a diferencia de lo observado en este trabajo, ninguno de los grupos antes mencionados reporta, claramente, la expresión de CXCR-4 en estroma y endotelio placentario.

En cuanto a la expresión de CCR5, también existen descripciones controversiales. Así, Douglas y col.(27), Al-Hartil y col. (20), Bebbahani y col.(21) reportan la ausencia de expresión de CCR-5 y de su ARN en células trofoblásticas, tanto cultivadas como *in situ*, pero, Bebbahani y col. reporta expresión de CCR-5 en placentas de mujeres con infección por VIH (21) y Tachutk y

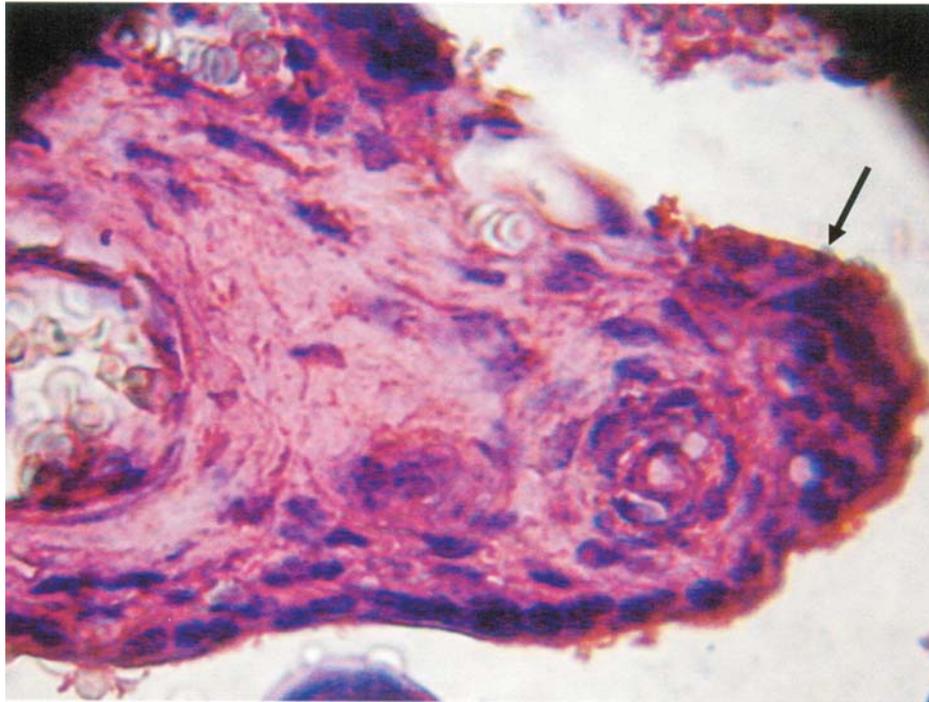


Fig. 5. Expresión de CCR5 en trofoblasto con tinción pardo-rojiza, de moderada intensidad. Aumento 40x.

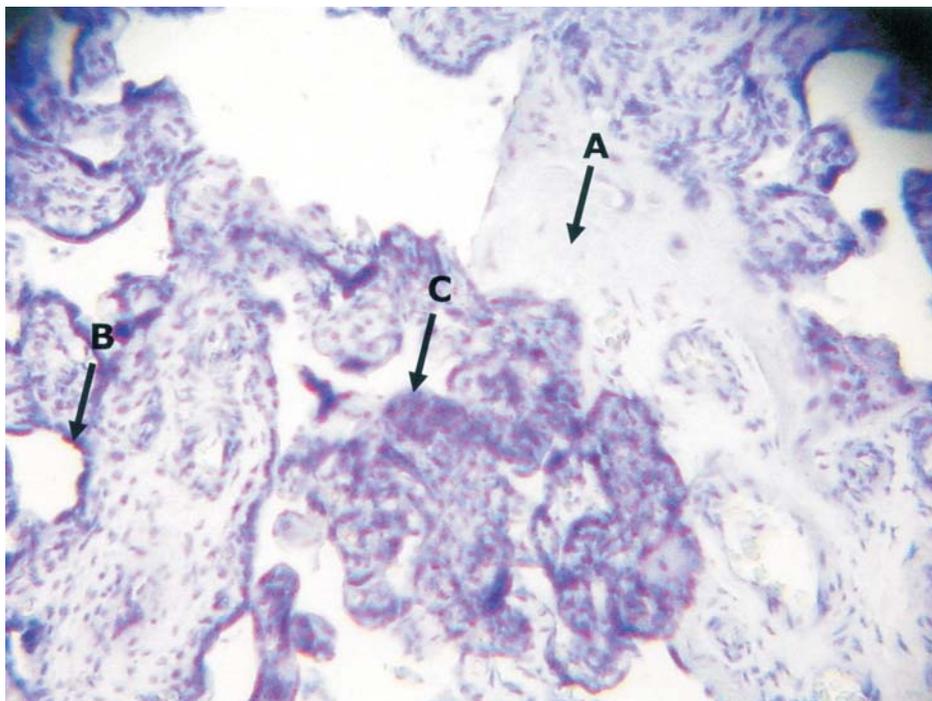


Fig. 6. Control negativo donde se observan estroma (A), endotelio (B) y trofoblasto (C), todas de color violáceo, indicando la ausencia de expresión de los receptores CCR5 y CXCR4. Aumento 10x.



Fig. 7. Expresión de CXCR4 en el estroma (A) y el trofoblasto (B) con intensa coloración en pardo-rojizo. Aumento 40x.

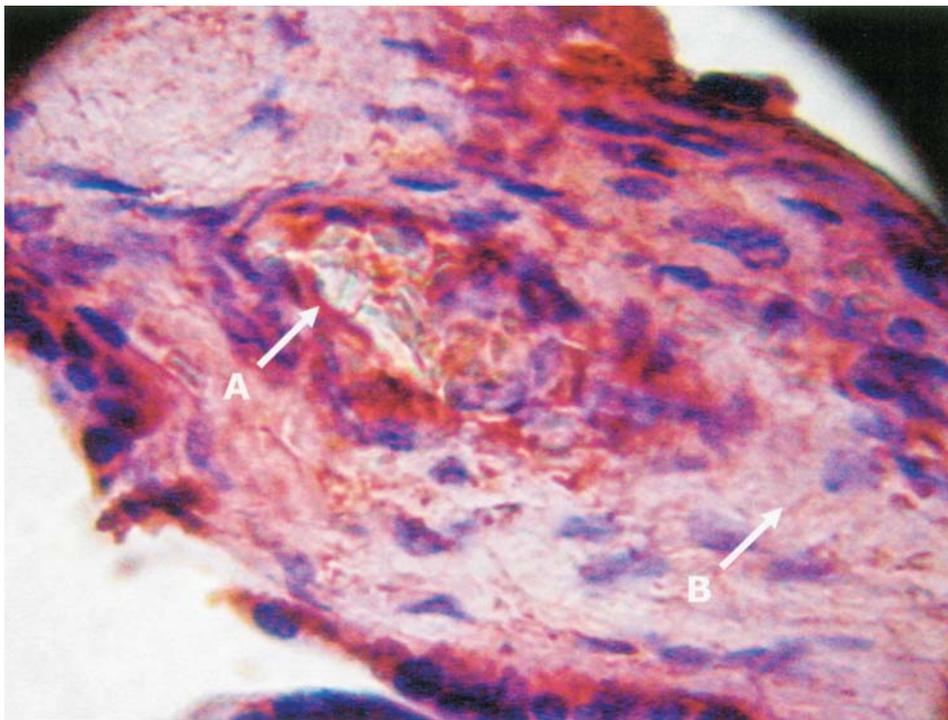


Fig. 8. Expresión de CXCR4 intensamente coloreado en el endotelio (A) y débilmente coloreado en el estroma (B). Aumento 40x.

col. en mujeres con infección por malaria (26). Atanassakis y col.(28) e Ishii y col. (29) reportan, al igual que este trabajo, expresión de este receptor tanto en placenta de ratones como en líneas coriocarcinomas, respectivamente. Por otro lado, Maldonado Estrada y col. (30) muestran que tanto CXCR-4 como CCR-5 se expresan en el citoplasma de células de placentas normales a término.

Varias razones pueden ser invocadas para explicar la variabilidad de los diferentes reportes. En primer lugar, la existencia de un elevado reciclaje de estas proteínas, variaciones interindividuales, edad gestacional, microambiente local de citocinas y presencia de agentes infecciosos (34). En segundo lugar, las diferentes técnicas y métodos utilizados por los diferentes grupos: células cultivadas o frescas, cortes al frío o parafinados, células tumorales o normales, infectadas o no, y la naturaleza de los anticuerpos monoclonales utilizados.

El hallazgo más importante en el presente trabajo es la evidencia de la expresión diferencial de CCR-5 y CXCR-4 en trofoblasto, endotelio y estroma, en las muestras de tejido placentario normal a término estudiadas. Siendo este, hasta donde conocemos, el primer reporte de la expresión de ambos receptores en todas las capas placentarias.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Eblen, por la revisión crítica del presente manuscrito. A Olga Regalado por su invaluable asistencia técnica. Al personal de la Maternidad "Armando Aray Solá" por su colaboración en la obtención de las muestras.

#### REFERENCIAS

1. **Mellor AL, Munn DH.** Immunology at the maternal-fetal interface: Lessons for T cell tolerance and suppression. *Ann Rev Immunol.* 2000; 18:367-391.
2. **Saito S.** Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol* 2001; 52:15-33.
3. **Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen, E.** Tolerance to the foeto-placental "graft": en ways to support a child for nine months *Curr Op Immunol.* 2000; 12: 731-737.
4. **Nishikawa K, Saito S, Morii T, Hamada K, Ako H, Narita N, Ichijo M, Kurahayashi M, Sugamura K.** Accumulation of CD16-CD56+ Natural Killer cells with high-affinity Interleukin-2 receptors in human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1991; 3:743-750.
5. **Jokhi PP, King A, Sharkey AM, Smith SK, Loke, YW.** Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidua lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Immunol* 1994; 153:4427-4435.
6. **Chantakru S, Kuziel AW, Maeda N, Croy AB.** A study on the density and distribution of uterine Natural Killer Cells at mid pregnancy in mice genetically-ablated for CCR2, CCR5 and the CCR5 receptor ligand, MIP-1 $\alpha$ . *J Reprod Immunol* 2001; 49:33-47.
7. **Wood GW, Hausman E, Choudhuri R.** Relative role of CSF-1, MCP-1/JE, and RANTES in macrophage recruitment during successful pregnancy. *Mol Reprod Dev* 1997; 46:62-67.
8. **Jones RL, Kelly RW, Critchley HOD.** Chemokine and ciclooxigenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. *Hum Reprod* 1997; 12:1300-1306.
9. **Zylla D, Li Y, Bergenstal E, Merrill JD, Douglas SD, Mooney K, Guo CJ, Song L, Ho WZ.** CCR5 expression and beta-chemokine production during placental neonatal monocyte differentiation. *Ped Res* 2003; 53:853-858.
10. **Nagaoka K, Nojima H, Watanabe F, Chang KT, Christenson RK, Sakai S, Imakawa K.** Regulation of blastocyst migration, apposition, and initial adhesion by chemokine, interferon gamma-inducible protein 10 kDa (IP-10), during early gestation. *J Biol Chem* 2003; 278: 29048- 29056.

11. **Red-Horse K, Drake PM, Gunn MD, Fisher SJ.** Chemokine ligand and receptor expression in the pregnant uterus: Reciprocal patterns in complementary cell subsets suggest functional roles. *Am J Pathol* 2001; 159:2199-2213.
12. **Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim J, Christine A.** International Union of Pharmacology XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52:145-176.
13. **Zlotnik A, Morales J, Hedrick, J.** Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999; 19: 1-47.
14. **Shixin Q, Rohrtman JB, Mayers P, Kassam N, Weinblatt M, Lotscher M.** The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Inv* 1998; 101:746-754.
15. **Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, ClarkLewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B.** The CXC chemokine SDF-1its ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382:833-835.
16. **Bleul C, Farzan M, Choe H, Parolin C, ClarkLewis I, Sodroski J, Springer T.** The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1, entry. *Nature* 1996; 382:829-833.
17. **Murdoch C.** CXCR-4:Chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev* 2000; 177: 175-184.
18. **Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW.** A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85:1149-1158.
19. **Dragic T, Litwin V, Allaway GP.** HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CD-CKR5. *Nature* 1996; 381: 667-673.
20. **Al-Harthil L, Guilbert LJ, Hoxie JA, Landay A.** Trophoblasts are productively infected by CD4-independent isolated of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retr* 2002; 1:13-17.
21. **Behbahani H, Popek E, García P, Andersson J, Spetz Al, Landai A, Flener Z, Patterson BK.** Up-regulation of CCR5 expression on the placenta is associated with human immunodeficiency virus-1 vertical transmission. *Am J Pathol* 2000; 157:1811-1818.
22. **Alkhatib G, Combadiere C, Border CC.** CKR5: a RANTES MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272: 1955-1958.
23. **Mognetti B, Moussa M, Croitoru J, Menu E, Dormont D, Roques P, Chouat G.** HIV-1 co-receptor expresión on trophoblastic cells from early placentas and permissivity to infection by several HIV-1 primary isolates. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 486-492.
24. **Valentin A, Trivedi H, Lu W, Kostrikis LG, Pavlakis GN.** CXCR4 mediatis entry and productive infection of syncytia-inducing (X4) HIV-1 strains in primary macrophages. *Virology* 2000; 269: 294-304.
25. **Misrahi M, Teglas JP, N'Go N, Burgard M, Mayaux MJ, Rouzioux C, Delfraissy JF, Blanche S.** CCR5 chemokine receptor variant in HIV-1 mother-to-child transmission and disease progression in children. *JAMA* 1998; 279:277-280.
26. **Tkachuk AN, Moormann AM, Poore JA, Rochford RA, Shensue SW, Mwapasa V, Meshnick SR.** Malaria enhances expression of CC chemokine receptor 5 on placental macrophages. *J Inf Dis* 2001; 183: 967-972.
27. **Douglas CG, Thirkill LT, Sideris V, Rabieh M, Trollinger D and Nuccitelli R.** Chemokine receptor expression by human syncytiotrophoblast. *J Reprod Immunol* 2001; 49:97-114.
28. **Atanassakis I, Papadimitriou L, Koumantakis E, Vassiliadis S.** TH1-and TH2-type lymphokine- assisted induction and release of chemokine receptors from primary human trophoblast cells. *Hum Immunol* 2000; 61:651-657.
29. **Ishii M, Hayakawa S, Suzuki MK, Yoshino N, Honda M, Nishinarita S, Chishima F,**

- Nagaishi M, Satoh K. Expression of functional chemokine receptors of human placental cells. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44:365-373.
30. Maldonado-Estrada J, Menu E, Roques P, Vaslin B, Dautry-Varsat A, Barre-Sinoussi F, Chaouat G. Predominant intracellular expression of CXCR4 and CCR5 in purified primary trophoblast cells from first trimester and term human placentae. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:291-301.
31. Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl, D, Prus D, Markel G, Gazit R, Katz G, Haimov-Kochman R, Fujii N, Yagel S, Peled A, Mandelboim, O. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* 2003; 102: 1569-1577.
32. Loke YW, King, A. Immunological aspects of human implantation. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 55: 83-90.
33. Tsuda H, Michimata T, Hayakawa S, Tanebe K, Sakai M, Fujimora M, Matsushima K, Saito S. A TH2 chemokine, TARC, produced by trophoblasts and endometrial gland cells, regulates the infiltration of CCR4+ T lymphocytes into human deciduas at early pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002; 48: 1-8.
34. Signoret N, Pelchen-Matthews A, Mack M, Proudfoot AE, Marsh M. Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5. *J Cell Biol* 2000; 151: 1281-1294.