



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL
DE CLASSE I NÃO CLÁSSICO NA PLACENTA BOVINA AO LONGO DA
GESTAÇÃO E APÓS INFECCÃO POR *Brucella abortus***

Larissa Sarmento dos Santos

São Luís – MA

2014

Larissa Sarmiento dos Santos

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL
DE CLASSE I NÃO CLÁSSICO NA PLACENTA BOVINA AO LONGO DA
GESTAÇÃO E APÓS INFEÇÃO POR *Brucella abortus***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Curso: Mestrado em Ciência Animal

Área de Concentração: Sanidade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho
Neta - UEMA

Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiane Alves Paixão -
UFMG

São Luís – MA

2014

Santos, Larissa Sarmiento dos.

Expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I não clássico na placenta bovina ao longo da gestação e após infecção por *Brucella abortus* / Larissa Sarmiento dos Santos. – São Luís, 2014.

49f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2014.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta

*Aos meus amados pais,
Ivaldo Paula dos Santos e
Laura de Fátima S. Santos.*

Esforçai-vos, e animai-vos; não temais, nem vos espanteis diante deles; porque o SENHOR teu Deus é o que vai contigo; não te deixará nem te desampará.

(Deuteronômio 31:6)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus preciosos pais, Ivaldo e Laura, pela educação, amor e incentivo nas horas mais difíceis, apesar da distância e saudade.

Aos meus amados irmãos, Fabrícia, Ivaldo Júnior e Manoela, pelos momentos compartilhados, sempre com bastante carinho e cumplicidade.

Ao meu namorado, Diego Luiz, pelo apoio incondicional nas horas mais difíceis, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Sou grata por cada gesto carinhoso e cada palavra de incentivo.

À Profa. Dra. Alcina, pela orientação, ensinamentos, confiança e paciência dispensados a mim, criando oportunidades para o meu crescimento profissional.

À Profa. Tatiane Paixão, pela ótima co-orientação, por toda disponibilidade, atenção, dedicação e profissionalismo, contribuindo muito para o enriquecimento da minha formação acadêmica e científica.

Ao Prof. Renato Santos, pela oportunidade, por todos os estímulos e desafios para a realização deste trabalho.

Aos queridos Juliana Mol e Auricélio Macedo, pelos ensinamentos, disposição e companheirismo, estando sempre dispostos a ajudar independente do dia, hora ou lugar. Vocês foram fundamentais para realização deste trabalho.

Às amigas, Ana Patrícia, Teane, Luciana e Cláudia, pela amizade, carinho e por estarem sempre dispostas a ajudar quando precisei.

Aos amigos, Mayra e Ermilton, pela parceria, risadas ou apenas pela companhia, tornando menos árduo este período.

Às amigas Rayule e Isabella, pela amizade e contribuição na correção em parte do trabalho.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (CAPES-PROCAD) por possibilitar o intercâmbio científico (UEMA/UFMG) e recurso financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELA E FIGURAS	7
	RESUMO	8
	ABSTRACT	9
1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Estrutura do Complexo de Histocompatibilidade Principal	12
2.2	Proteínas do MHC-I Clássicas (MHC-Ia) e não clássicas (MHC-Ib)	16
2.3	Desenvolvimento fetal e placentação bovina	17
2.4	MHC Classe I na Reprodução	19
2.5	Infecção por <i>Brucella abortus</i> em bovinos	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Geral	21
3.2	Específicos	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Expressão MHC I não clássico na placenta bovina	21
4.1.1	Colheita de amostras	21
4.1.2	Extração de RNA	22
4.1.3	Síntese de cDNA	23
4.1.4	PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)	23
4.2	Perfil de MCH 1 não clássico em explantes trofoblastos bovinos infectados com <i>Brucella abortus</i>	24
4.2.1	Amostra bacteriana	24
4.2.2	Confecção e infecção dos explantes de membrana corioalantóidea	24
4.2.3	Extração de RNA e confecção de cDNA	26
4.2.4	PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	27
4.3	Análise estatística	29
5	RESULTADOS	29
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	38
	REFERENCIAS	39

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Tabela 1. Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real	27
Figura 1. Representação esquemática comparando a organização genética do MHC bovino (BoLA) no cromossomo 23 do <i>Bos taurus</i> com MHC humano (HLA).	14
Figura 2. Localização aproximada dos genes em parte da região de MHC de classe I no cromossomo 23 bovino. Triângulos pretos: genes de MHC não de classe I não clássicos os genes MIC; triângulos cinzas: pseudogenes de MHC; triângulos brancos: genes de MHC de classe I clássicos; pequenos triângulos branco: genes não-MHC.	15
Figura 3. Demonstração da colheita de material. Assepsia do útero gestante (A), abertura do corno uterino gestante (B). Exposição da membrana corioalantóidea (C). Retirada de um fragmento do placentoma (D). Preparação dos explantes da membrana corioalantóidea (E). Preparação da placa de cultivo dos explantes para inoculação com <i>B. abortus</i> (F).	28
Figura 4. Expressão de MHC de classe I não clássico (MICB) no placentoma e região intercotiledonária em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro terços da gestação). Colunas representam média aritmética (n = 6) e erro padrão. *Indica diferença estatística significativa entre os diferentes terços gestacionais (p < 0,05). #Indica diferença estatisticamente significativa na transcrição de NC3 em diferentes tecidos da placenta no mesmo terço de gestação (p <0,05).	30
Figura 5. Expressão de MHC de classe I não clássico (NC3) no placentoma e região intercotiledonária em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro terços da gestação). Colunas representam média aritmética (n = 6) e erro padrão. *Indica diferença estatística significativa entre os diferentes terços gestacionais (p < 0,05). #Indica diferença estatisticamente significativa na transcrição de NC3 em diferentes tecidos da placenta no mesmo terço de gestação (p <0,05).	31
Figura 6. Expressão de MHC de classe I não clássico (NC1) no placentoma e região intercotiledonária em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro terços da gestação). Colunas representam média aritmética (n = 6) e erro padrão.	31
Figura 7. Expressão de MHC de classe I genérico no placentoma e região intercotiledonária em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro terços da gestação). Colunas representam média aritmética (n = 6) e erro padrão.	32
Figura 8. Expressão de MHC de classe I clássico (MHC-I genérico) e não clássico (MICB, NC1 e NC3) em células trofoblásticas bovinas 4 horas após infecção com <i>Brucella abortus</i> . As variações nos níveis de transcrição de cada gene avaliado foram obtidas em relação ao grupo controle não infectado. Colunas representam média geométrica (n = 5) e erro padrão.	34

RESUMO

Os genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I não clássicos são monomórficos ou oligomórficos e possuem expressão celular restrita. Além disso, os produtos destes parecem ter diversas funções, dentre elas, atuar como ligantes para receptores inibitórios do complexo natural killer durante a gestação, protegendo o feto da rejeição materna. Considerando a hipótese de que ocorre expressão de MHC-I não clássico em diferentes regiões da placenta bovina variando ao longo da gestação e que a interação entre *Brucella abortus* e células trofoblásticas altera o perfil de expressão desses genes, este trabalho teve como objetivos caracterizar a expressão de MHC-I não clássico na placenta bovina ao longo da gestação, bem como verificar a expressão destes em células trofoblásticas durante o terceiro trimestre de gestação após estimulação com *B. abortus*. O RNA extraído do placentoma e região intercotiledonária de vacas no primeiro (n=6), segundo (n=6) e terceiro (n=6) trimestres de gestação foi submetido ao RT-PCR em tempo real. Foram confeccionados explantes da membrana córionialantóidea e estabelecidos dois grupos experimentais: controle e infectado. A infecção foi procedida com a amostra de referência *B. abortus* 2308 ($1,0 \times 10^7$ UFCs) por quatro horas para avaliação do perfil de expressão gênica. Os resultados demonstram que a expressão de MICB e NC3 diferiu significativamente entre diferentes regiões da placenta bovina, com níveis mais elevados de expressão nas áreas intercotiledonárias, quando comparado ao placentoma. Além disso, tais genes foram mais expressos no segundo trimestre de gestação ($p < 0,05$). O gene NC1 e o MHC-I genérico foram pouco expressos em ambos os tecidos. As células trofoblásticas infectadas com *Brucella abortus* apresentaram aumento na expressão dos genes MHC-I genérico, MIC, NC1 e NC3 em relação ao grupo controle não infectado. Assim, este estudo demonstrou que alguns MHC de classe I clássico e não clássico são expressos em diferentes tecidos e em diferentes períodos de gestação na placenta bovina. Além disso, a região intercotiledonária é responsiva à infecção com *B. abortus*, resultando em ligeiro aumento na transcrição dos genes.

Palavras-chave: MHC-Ib, célula trofoblástica, *Brucella abortus*

ABSTRACT

Nonclassical Major Histocompatibility Complex Class I genes are monomorphic or oligomorphic and have restricted cellular expression. Moreover, their products seem to have different functions, among them, act as ligands for inhibitory receptors of the natural killer complex during pregnancy, protecting the fetus from maternal rejection. Considering the hypothesis that occurs variable nonclassical MHC-I expression in different regions of the bovine placenta throughout pregnancy and that the interaction between *Brucella abortus* and trophoblast cells alters the expression profile of these genes, this study aimed to characterize the expression of nonclassical MHC-I in bovine placenta throughout pregnancy, as well as verify these expression in trophoblast cells during the third trimester of pregnancy after infection with *B. abortus*. The RNA extracted from placentome and intercotyledonary region of cows during the first (n=6), second (n=6) and third (n=6) trimesters of pregnancy, was subjected to RT-PCR. Explants were prepared from chorioallantoic membrane, and two experimental groups were determined: control and infected. Infection was performed with the reference sample *B. abortus* 2308 (1.0×10^7 CFU) for four hours to assess the gene profile expression. The non-classical MHC-I genes MICB and NC3 had higher levels of transcription in the intercotyledonary region when compared to the placentome, which higher levels of transcription at the second trimester of gestation. NC1 and classical MHC-I had very low levels of transcription. Trophoblastic cells of *B. abortus*-infected chorioallantoic membrane explants had a mild increase in transcription of non-classical MHC-I at 4 h post infection. Therefore, this study provides a thorough analysis of non-classical MHC-I transcription at different stages of gestation and different placental tissues, with an increased transcription of some non-classical MHC-I genes, mostly in the intercotyledonary region at mid gestation. Furthermore, this study demonstrated that *B. abortus* infection is associated with mild upregulation of non-classical MHC-I in bovine placental tissues.

Keywords: MHC-Ib, trophoblastic cell, *Brucella abortus*

1 INTRODUÇÃO

A comunicação adequada entre mãe e feto é crucial para o sucesso da gestação e ocorre por meio da placenta na maioria dos mamíferos. A tolerância ao feto parece envolver tanto a falta de expressão de antígenos polimórficos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) nas células trofoblásticas da placenta, como a manutenção de um estado de repouso ou imunologicamente imunossupressor no útero.

O MHC codifica dois tipos de proteínas de superfície celular extremamente polimórficas, MHC de classe I e II, as quais apresentam antígenos peptídicos à linfócitos T. O MHC classe I é expresso na superfície das células nucleadas e faz apresentação dos antígenos peptídeos endógenos digeridos no citosol às células T citotóxicas (CD8+). O MHC classe II é expresso principalmente nas células apresentadoras de antígenos e apresenta os antígenos exógenos processados às células T auxiliares (CD4+) (Kelley et al., 2005).

Existem dois grupos de MHC de classe I, clássicos e não clássicos. As moléculas clássicas são expressas na maioria das células somáticas e apresentam peptídeos derivados do próprio animal ou de proteínas de patógenos intracelulares para linfócitos T citotóxicos. Em algumas espécies de mamíferos, células trofoblásticas não expressam moléculas clássicas (Hunt et al., 1987; Gogolin-Ewens et al., 1989; Donaldson et al., 1990).

Acredita-se que a falta de expressão de MHC-I clássico na placenta ocorra para proteger o feto do sistema imune materno. Esta hipótese é apoiada em experimentos que demonstraram que aloenxertos expressando antígenos clássicos não sobreviveram no útero (Hunt et al., 1987; Gogolin-Ewens et al., 1989).

Adicionalmente, os genes de MHC classe I não clássicos são monomórficos ou oligomórficos e possuem expressão celular restrita (Davies, 2007). Além disso, os produtos destes parecem ter diversas funções, dentre elas, atuar como ligantes para receptores de leucócitos, incluindo os receptores inibitórios codificados no complexo natural killer (Shiroish et al, 2003; LeMaout et al, 2004; Parham, 2005). Um exemplo de proteína de MHC de classe I não clássico é o antígeno leucocitário humano G (HLA-G). A proteína HLA-G é expressa especificamente por citotrofoblasto invasivo e modula a resposta imunitária no útero humano, protegendo estas células da resposta iniciada pelos linfócitos T e células NK (Hunt et al., de 2005).

Em bovinos, a expressão de MHC-I é diferente dos humanos (Davies, 2007). Células trofoblásticas bovinas na região intercotiledonária da placenta expressam proteínas de MHC-I clássicas e não clássicas durante o terceiro trimestre de gestação (Davies et al., 2006; Davies et al., 2000). Acredita-se que essas diferenças não possuam efeito adverso na gestação, pelo contrário, são provavelmente benéficos para o estabelecimento da gestação em bovinos (Joosten et al., 1991).

Recentemente, pesquisas têm-se centrado principalmente na expressão de MHC de classe I em trofoblastos e sangue materno no último trimestre de gestação em bovinos (Davies et al., 2006; Shu et al., 2012), entretanto não tem sido investigada a expressão de genes de MHC-I não clássico nos trofoblastos em diferentes regiões da placenta ao longo da gestação e, portanto, o seu efeito sobre o estabelecimento da gestação e chegada do feto.

Além do papel importante na manutenção da gestação, a expressão de MHC-I não clássico tem sido observada em uma variedade de condições patológicas em humanos, tais como infecções virais e bacterianas, (Garcia et al., 2011; Mir & Sharma, 2013) e tumores (Groh et al., 2002; Salih et al., 2002; Salih et al., 2003; Doubrovina et

al., 2003). Em bovinos, pesquisas relatam o papilomavírus bovino 4 não afeta a expressão do MHC-I não clássico (Arabi et al., 2006), contudo não há estudos sobre a interação entre MHC-I não clássico com microrganismos que causam aborto no terço final de gestação em bovinos, em especial *Brucella abortus*.

Considerando a hipótese de que ocorre expressão de MHC-I não clássico em diferentes regiões da placenta bovina variando ao longo da gestação e que a interação entre *Brucella abortus* e células trofoblásticas altera o perfil de expressão desses genes, este trabalho teve como objetivos caracterizar a expressão de MHC-I não clássico na placenta bovina ao longo da gestação, bem como verificar a expressão destes em células trofoblásticas durante o terceiro trimestre de gestação após infecção com *B. abortus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura do Complexo de Histocompatibilidade Principal

Os genes do complexo de histocompatibilidade, que codificam aloantígenos extremamente potentes na estimulação à rejeição de tecidos transplantados, foram primeiramente descobertos em camundongos (Klein, 1975). Tal descoberta levou à identificação de um loci de codificação em humanos e camundongos (Klein, 1978; Klein, 1979; Svejgaard et al., 1975).

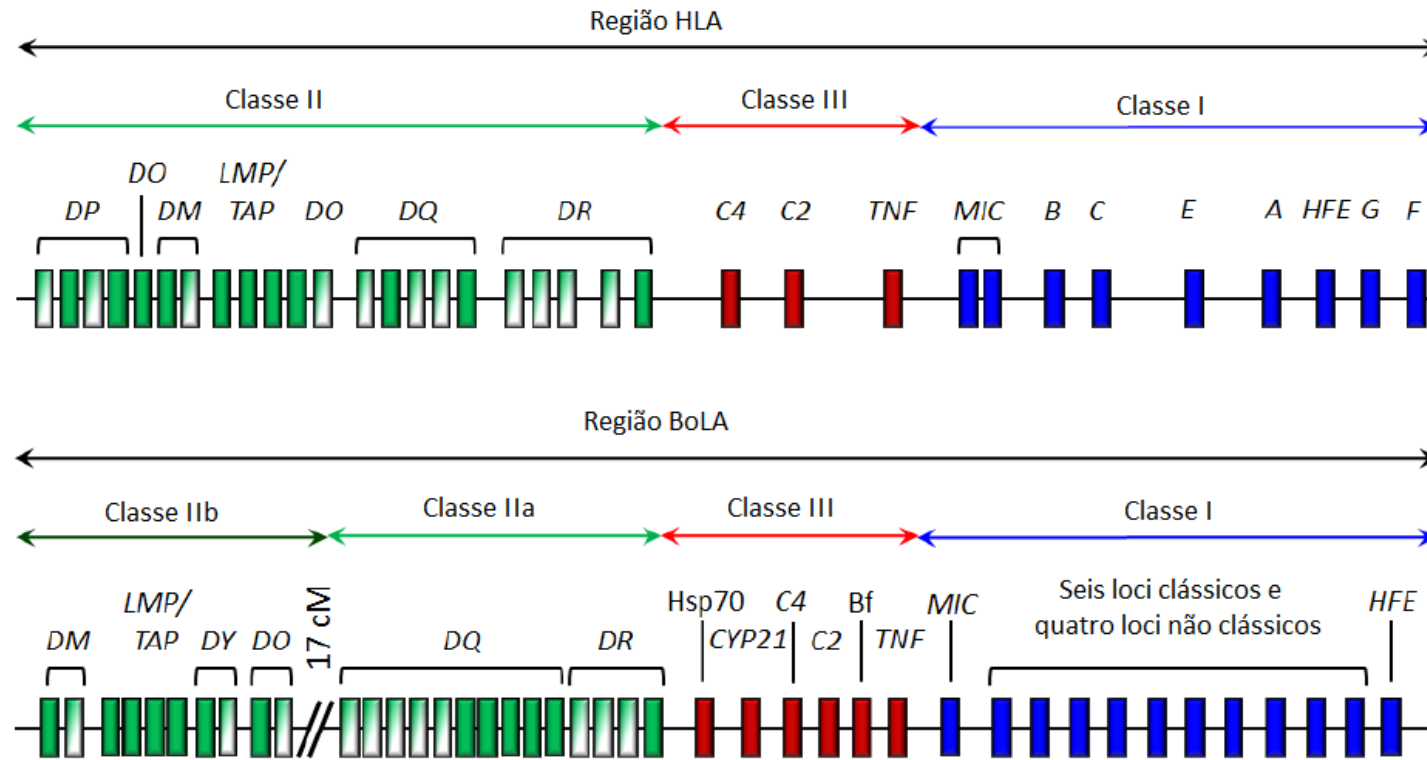
O MHC humano, conhecido como complexo antígeno leucocitário humano (HLA), e do camundongo, o complexo H-2, estão localizados nos cromossomos 6 e 17, respectivamente. Nos bovinos, o complexo antígeno leucocitário bovino (BoLA), situa-se autossomo 23. A estrutura genética do BoLA foi descrita pela primeira vez por Spooner et al. (1978; 1979).

Existem duas classes de glicoproteínas de MHC: MHC-I e MHC-II. Proteínas da classe I compreendem uma cadeia de polipeptídeo alfa (α), uma subunidade não-covalente de 44 kD de peso molecular, que é ligada a uma cadeia de 12 kD chamado β_2 microglobulina (β_2m) que contribui para formar uma proteína estável de superfície celular presente na maioria das células nucleadas (Tizard, 2002).

As proteínas de MHC-II são heterodímeros compostos por uma cadeia polipeptídica alfa (α) e beta (β). As moléculas de classe II são expressas nas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), tais como células dendríticas (DC), macrófagos e células B, entretanto, não são expressas em células trofoblásticas da placenta (Cresswell, 1994).

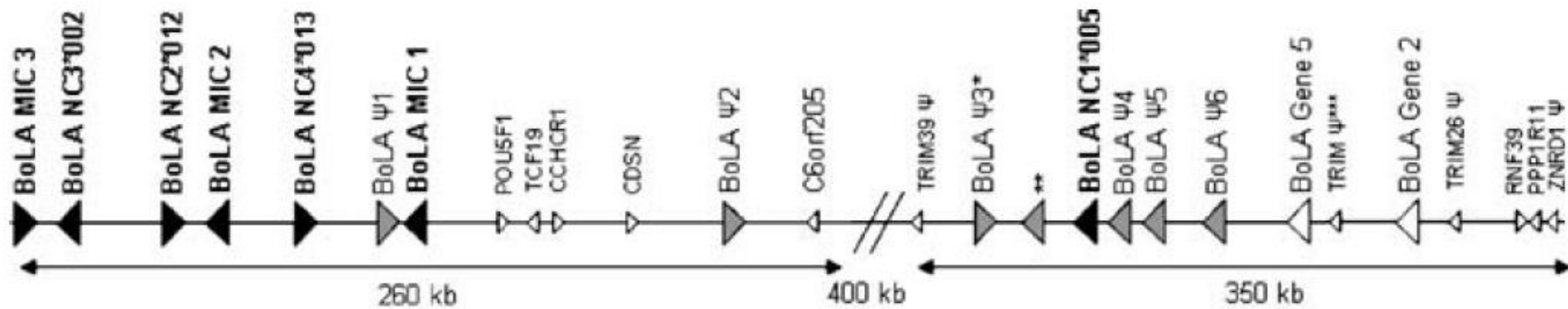
A estrutura geral do MHC nos mamíferos é relativamente conservada. O complexo BoLA está dividido em três regiões – BoLA-I , BoLA-II e BoLA-III com diferentes funções (Figura 1). Existem pelo menos seis genes do MHC-I clássicos na região BoLA-I, que são expressos em combinações de um, dois ou três haplótipos diferentes (Birch et al., 2008a). Além disso, a região do BoLA-I (Figura 2) contém quatro loci BoLA de classe I não-clássicos, NC1 - NC4 (Davies et al., 2006).

O BoLA-II foi subdividido em BoLA-IIa e IIb – com base no mapeamento genético (Andersson et al., 1988; van Eijk et al., 1993). A sub-região BoLA-IIa contém o conjunto de genes DR e DQ (Andersson et al., 1986; Scott et al., 1987). As sub-regiões BoLA-IIa e BoLA-IIb estão a cerca de 15 centímetros de distância. A sub-região BoLA-IIb inclui os genes DMA, DMB, LMP2, LMP7 e TAP cujos produtos estão envolvidos no processamento de antígenos e transporte (Davies et al., 1997; Lewin, 1996; Russell et al., 1997). A região BoLA-III contém genes como CYP21, BF, HSP70 e C4 que não são considerados parte do MHC (Antczak et al., 1982; Lewin, 1996).



Fonte: Codner, 2010

Figura 1. Representação esquemática comparando a organização genética do MHC bovino (BoLA) no cromossomo 23 do *Bos taurus* com MHC humano (HLA).



Fonte: Birch et al., 2008

Figura 2. Localização aproximada dos genes em parte da região do MHC de classe I no cromossomo 23 bovino. Triângulos pretos: genes de MHC de classe I não clássicos; triângulos cinzas: pseudogenes de MHC; triângulos brancos: genes de MHC de classe I clássicos; triângulos branco pequenos: genes não-MHC.

2.2 Proteínas do MHC-I Clássicas (MHC-Ia) e não clássicas (MHC-Ib)

As proteínas de MHC-Ia, clássicas, são encontradas em todas as células nucleadas, possuem altos níveis de expressão e são extremamente polimórficas com um grande número de alelos presentes na população. Essas glicoproteínas transmembranares desempenham um papel importante na regulação imune, estando envolvidas na apresentação de antígenos para as células T citotóxicas (CD8⁺) (Zinkernagel & Doherty, 1975).

Os genes de MHC-Ib, não clássicos, são monomórficos ou oligomórficos e muitas vezes possuem códons de parada prematuros no domínio transmembrana. Semelhante aos genes da classe Ia, a maioria dos genes da classe Ib têm oito exons que codificam a cadeia pesada. O exon 1 codifica a sequência de sinal que é clivada depois a proteína sintetizada é direcionada para o retículo endoplasmático (ER). Os exons 2, 3 e 4 codificam os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, que formam a porção extracelular da proteína. O domínio da transmembrana é codificado pelo exon 5. Os exons 6 e 7, e, às vezes, parte do exon 8, codificam o domínio citoplasmático (Birch et al., 2006).

Ao contrário das proteínas do MHC-Ia, as proteínas não clássicas da classe I (MHC-Ib) são expressas em tecidos específicos e sob condições específicas. Estas proteínas têm frequentemente um domínio citoplasmático truncado. Como resultado de um “splicing” alternativo, estas proteínas são produzidas como isoformas transmembranares e solúveis (Hunt et al., 2005). O processo de splicing alternativo determina a natureza segregada ou ligada ao lipídeo de algumas moléculas de classe Ib, tais como HLA-G (HLA-G2) e Qa-2 (Hunt et al., 2006).

Em contraste com as moléculas de classe Ia, que requerem ligação com uma cadeia leve ou de $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2m$) para a sua expressão na superfície celular (Ishitani et al., 1992; Sakaguchi, 2000; Trowsdale, 2001; Tysoe-Calnon et al., 1991),

proteínas de MHC-Ib nem sempre exigem uma cadeia leve para a sua expressão (Hunt et al., 2005).

Genes relacionados à cadeia do MHC de classe I (MIC) foram identificados dentro da região de MHC de um determinado número de espécies de mamíferos, incluindo humanos e outros primatas, suínos e bovinos (Bahram et al., 1994). Codificam glicoproteínas com estrutura de domínio semelhante às moléculas do MHC-I clássico, no entanto, apresentam algumas diferenças significativas: não se associam com microglobulina β_2 , possuem padrão diferente de polimorfismo e não tem uma região de ligação ao peptídeo (Holmes et al., 2002). Os padrões de expressão também são diferentes, sendo induzidas pelo estresse celular, principalmente em células epiteliais e endoteliais (incluindo tumores), embora a indução da expressão em outros tipos de células também tem sido relatada (Collins, 2004).

Em bovinos, três genes MIC foram identificados, e pelo menos um gene MIC foi encontrado em todos os haplótipos de classe I que foram analisados (Birch et al. 2008b). Os genes de MIC são posicionados próximos a três genes do MHC de classe I não clássico, BoLA NC2, NC3 e NC4 (Figura 2) (Birch et al. 2008a).

2.3 Desenvolvimento fetal e placentação bovina

Apesar de sua natureza alogênica, o feto normalmente não é rejeitado pelo sistema imune materno. O embrião precoce é formado por blastômeros, que são células indiferenciadas resultantes da clivagem do óvulo fertilizado (zigoto). Após uma série de divisões e compactação, o embrião forma uma massa compacta de 16-32 blastômeros, conhecida como mórula. A mórula desenvolve-se em uma cavidade cheia de fluido com mais de uma centena de células, conhecida como blastocisto. Um blastocisto possui dois tecidos distintos, a camada exterior formada por trofoblastos em torno da cavidade cheia de fluido (blastocelo), o que dá origem aos tecidos extra embrionários e a massa celular

interna que dá origem ao disco embrionário e, eventualmente, ao embrião propriamente dito. Juntamente com a mesoderme somática, a camada de trofoblastos é conhecida como cório (Moore & Persaud, 2008).

Em bovinos, o período de gestação é de 285 dias e o alanto-cório começa a se fixar no útero gravídico com cerca de quatro semanas de gestação. Com o crescimento das membranas embrionárias dentro do lúmen uterino, a superfície do alanto-cório começa a formar os cotilédones sobre áreas especializadas do endométrio denominadas de carúncula. A superfície caruncular desenvolve criptas e o alanto-cório forma projeções digitiformes, que entram nas criptas, aumentando a área de superfície de contato entre o endométrio e os trofoblastos (Schlafer et al., 2000).

A combinação entre o cotilédone e a carúncula forma o placentoma. O alanto-cório que desenvolve e se contrapõe ao endométrio entre os placentomas é a membrana corioalantóidea interplacentomal. O alanto-cório, cotiledonar e intercotiledonar, é responsável pela absorção de nutrientes fornecidos para as demandas metabólicas do feto e o crescimento do tecido fetal (Atkinson et al., 1984).

A maioria das células trofoblásticas nos ruminantes é uninucleada, entretanto, uma característica importante da placenta do ruminante é a presença de células binucleadas ou células trofoblásticas gigantes, que se desenvolvem por mitose de células trofoblásticas uninucleadas. As células binucleadas (CBN) constituem 15-20% das células trofoblásticas bovinas. As células trofoblásticas binucleadas fundem-se com as células epiteliais uterinas, tanto nos placentomas quanto na região interplacentomal, para formar células trinucleadas (Wooding et al., 1992; Klisch et al., 2010;).

As CBN secretam glicoproteínas associadas à gravidez em bovinos (Wooding et al., 2005), como a progesterona, fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) e lactogênio placentário que atuam como imunomoduladores locais para manter a

gravidez, bem como auxiliar no metabolismo e desenvolvimento de placentomas (Duello et al., 1986; Munson et al., 1996).

Em ruminantes, a placenta é classificada como epiteliocorial, sendo formada quando o tecido fetal entra em contato com o tecido materno, para permitir a interação fisiológica entre a mãe e o feto. As células binucleadas migram para o epitélio uterino e fundem-se com as células epiteliais, segregando os grânulos para o lado basal do útero. Estes grânulos de secreção proporcionam o mecanismo de transferência de proteínas do MHC-I para o lado materno da placenta. As células T $\gamma\delta$ também foram encontradas no epitélio uterino durante a gravidez nos ruminantes (Lee et al., 1992; Majewski et al., 2002; Rahman et al., 2006). Estas células desempenham um papel no desenvolvimento do conceito, imunossupressão e descolamento da placenta durante o parto.

2.4 MHC Classe I na Reprodução

Em algumas espécies de mamíferos, as células trofoblásticas maduras não expressam proteínas classe I clássicas extremamente polimórficas (Donaldson et al., 1990; Gogolin-Ewens et al., 1989; Hunt et al., 1987). Em humanos, fetos expressando proteínas de classe I clássicas, durante o primeiro trimestre de gestação não sobrevive no útero (Beer & Billingham, 1974).

Alguns trabalhos têm demonstrado que em bovinos, as células trofoblásticas na região interplacentomal possui padrão único de expressão de MHC-I. Na gestação normal, os trofoblastos bovinos não expressam MHC-I antes de 120 dias de gestação, enquanto, a expressão de MHC de classe Ia e Ib por células trofoblásticas na região interplacentomal durante o último trimestre em bovinos é normal (Davies et al., 2006; Davies et al., 2000).

A razão entre a expressão de genes de classe Ia e Ib varia consideravelmente durante a gestação em bovinos. Cerca de 34-79% dos transcritos em células trofoblásticas interplacentomal no terceiro trimestre de gestação são codificadas por genes da classe Ib (Davies et al., 2006).

2.5 Infecção por *Brucella abortus* em bovinos

A *Brucella* penetra no organismo dos mamíferos pelas mucosas do trato digestório, genital ou nasal, conjuntiva ocular ou por soluções de continuidade da pele. Em bovídeos, a principal porta de entrada é a mucosa orofaríngea. Do aparelho digestório superior, são carregadas aos linfonodos e fagocitadas principalmente por macrófagos, onde podem permanecer quiescentes por meses (Acha & Szyfres, 2001).

Os fatores envolvidos com a patogenicidade do gênero *Brucella* são aqueles que permitem a invasão, a sobrevivência e a multiplicação intracelular nas células do hospedeiro. Um aspecto importante na patogênese, que confere a característica de bactéria patogênica intracelular é a habilidade de aderência e invasão de fagócitos e células não fagocíticas, além da capacidade de estabelecimento e replicação no interior das células do hospedeiro (Gorvel & Moreno, 2002).

A capacidade de *B. abortus* de evadir da resposta imune do hospedeiro se dá em função de sua constituição bioquímica com um LPS não clássico inibindo a resposta inflamatória nos estágios iniciais da infecção (Carvalho Neta et al., 2008; 2009).

Brucella abortus causa aborto no terço final de gestação em função do seu tropismo pela placenta (Xavier et al., 2009), devido a elevadas concentrações de eritritol e hormônios esteróides neste período gestacional. O eritritol atua como agente facilitador da sobrevivência bacteriana servindo de fonte de energia para *B. abortus* (Samartino & Enright, 1996). As células trofoblásticas eritrofagocíticas, localizadas na base das vilosidades coriônicas (Santos et al., 1996), atuam como porta de entrada de *B.*

abortus para placenta, com posterior extensão da infecção para os trofoblastos intercotiledonários (Anderson et al., 1986).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a expressão gênica de MHC de Classe I não clássico em diferentes estágios de gestação em bovinos e após infecção por *Brucella abortus*.

3.2 Específicos

- Determinar o perfil de expressão gênica de MHC-I clássico e não clássico em diferentes regiões da placenta bovina em diferentes estágios de gestação.
- Verificar se há diferença de expressão dos genes de MHC-I clássicos e não clássicos em células trofoblásticas bovinas infectadas com *Brucella abortus* em relação às células não infectadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Expressão MHC I não clássico na placenta bovina

4.1.1 Colheita de amostras

Foram utilizadas 18 placentas de vacas mestiças em diferentes estágios gestacionais (seis de cada trimestre de gestação) obtidos de abatedouros da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. O Protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CETEA-UFMG, Protocolo 170/2009).

Para determinação do período gestacional, os fetos foram divididos em três grupos, de acordo com o estágio de gestação. Para tanto, foram feitas mensurações céfalo-coccígeas dos fetos (da nuca até a base da cauda) e interpretadas segundo a fórmula $x = 2,5(y + 21)$ (Richardson, 1989), onde x é a variável “idade da gestação” e y representa o comprimento ápico-caudal, estimando-se assim o período gestacional.

Imediatamente após o abate, foi feita anti-sepsia cuidadosa do perimétrio, utilizando-se álcool iodado, seguida da abertura do útero com exposição e retirada asséptica de fragmentos da região intercotiledonária e placentoma (Figura 3A-D). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em criotubos estéreis, congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e estocados a -80°C até a extração de RNA.

Para o estímulo da região intercotiledonária com *Brucella abortus*, foram utilizados cinco úteros intactos, no terceiro trimestre de gestação, também provenientes de abatedouros do Estado de Minas Gerais.

4.1.2 Extração de RNA

Para a extração de RNA, primeiramente o tecido coletado foi macerado e adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) em microtubo livre de RNase. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio, homogeneizado vigorosamente e incubado em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 $\times g$ por 15 min a 4°C , para separação em três fases. A fase superior foi transferida para outro microtubo e adicionar-se-á 500 μL de isopropanol, para precipitação do RNA, incubada em temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 12.000 $\times g$ por 10 min a 4°C . O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70%, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 7.500 $\times g$ por 5 min a 4°C . Posteriormente, o RNA foi dissolvido em 30 μL de água livre de RNase. A qualidade

das amostras foi analisada por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose/formaldeído.

4.1.3 Síntese de cDNA

O RNA (1,5 µg) foi retrotranscrito em cDNA utilizando-se o kit comercial *Super Script III First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para uma reação de volume final de 20µL. Para a síntese foram utilizados 3,0 µL de água DEPC, 1,0µL de *Random Hexâmero* (50µg/µL), 1,0 µL de *Anneling Buffer*, 2,0 µL de *RNase OUTTM Enzime Mix*, 10,0 µL de *2x First-Strand Reaction Mix*. Os parâmetros utilizados para a síntese do cDNA foram: 65° C por 5 minutos, incubado em gelo por 1 minutos, 25° C por 10 minutos, 50° C por 50 minutos. Posteriormente o cDNA foi armazenado a -20°C.

4.1.4 PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

Foram utilizados um par de primer genérico de MHC de classe 1, denominado Bov 7 e 11 (Birch, 2006), que amplifica uma sequência de MHC-I clássico e alelos não clássicos do locus NC1, e primers específicos para MHC-I não clássicos, NC1, NC3 e MIC-B (Shu et al., 2012), descritos na Tabela 1.

O RT-PCR em tempo real foi realizado utilizando-se 2,5 µl de cDNA, 10 µM do par de primers específico para cada gene e 12,5 µl de SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen) em um volume final de 25 µl por reação. Os parâmetros utilizados para o PCR em tempo real foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando um termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems).

Os dados foram analisados utilizando o método Ct comparativo (Livak & Schmittgen, 2001). Os valores de Ct foram normalizados com base na expressão de GAPDH.

4.2 Perfil de MCH 1 não clássico em explantes trofoblastos bovinos infectados com *Brucella abortus*

4.2.1 Amostra bacteriana

O inóculo foi preparado a partir do crescimento por 12-15 horas, sob agitação, e a 37°C da amostra *B. abortus* 2308 cultivada em caldo *Brucella* (Difco; Lawrence, KS, USA). Após o período de incubação, a densidade óptica bacteriana foi determinada por espectrofotometria (OD₆₀₀) e ajustada para $1,0 \times 10^8$ bactérias. Para confirmação da densidade óptica bacteriana dos inóculos foram feitas diluições seriadas na base 10 do inóculo em PBS (pH 7,4) e 100 µL de cada diluição foram semeados em placas de ágar triptose (Difco, EUA) em duplicata. Após 48 h de incubação das placas a 37°C com 5% de CO₂ foi feita a contagem das colônias e o número de bactérias foi obtido pela média das triplicatas. A manipulação do agente e material infectado foi realizada em condições de biossegurança de nível 3 (Richmond & Mckinney, 1993; Teixeira & Valle, 1996).

4.2.2 Confecção e infecção dos explantes de membrana corioalantóidea

Neste estudo foi usado sistema de insertos Snapwell (*Transwell® Cell Culture Permeable Supports – Snapwell™ Inserts - Corning Incorp.*, NY) de membrana córioalantóidea, baseado na metodologia descrita por Samartino e Enright (1992) e modificada por Carvalho-Neta et al. (2008). Para isso, foram obtidos cinco úteros bovinos intactos no terço final de gestação em abatedouros de Belo Horizonte-MG.

Foram usadas apenas as placentas provenientes de fetos com 65 a 83 cm de comprimento, correspondente a 180 - 240 dias ou último trimestre de gestação e com resultado negativo para *Brucella* spp. ao teste sorológico Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) usando líquido amniótico do feto coletado (Brasil, 2006). Foi feita assepsia cuidadosa do perimétrio, usando álcool iodado, seguida da abertura do útero com exposição e retirada asséptica da membrana cório-alantóidea que foi mantida por 20 minutos em meio de cultura RPMI 1640 estéril (Invitrogen, USA) contendo antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). A seguir, a membrana foi lavada duas vezes em meio de cultura RPMI (Invitrogen, USA) a 37°C e estéril para completa remoção do antibiótico. O Protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CETEA-UFMG, Protocolo 170/2009).

Para confecção dos explantes, os anéis dos suportes destacáveis e estéreis foram posicionados sobre a membrana cório-alantóidea, nas porções intercotiledonárias, em contato com as células do epitélio trofoblástico, e pressionados contra a membrana do explante (Figura 3E). O excesso de tecido foi retirado em torno dos anéis do suporte para individualização dos explantes que foram colocados em placas de cultivo celular (*Corning Incorp.*, NY) de 6 poços, estéreis, contendo meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com glutamina 4 mM, piruvato 1 mM, aminoácidos não-essenciais 1 mM, bicarbonato de sódio 2,9 mM e 15% de soro fetal bovino (Invitrogen – USA) e incubados a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Foi acrescentado ao orifício central do explante, local a ser inoculado com *B. abortus*, o meio RPMI 1640 enriquecido (Figura 3F).

Os explantes de membrana cório-alantóidea foram inoculados no espaço central de cada membrana de crescimento do explante com 200 µL de meio de cultura

(RPMI 1640), contendo $1,0 \times 10^8$ UFC de *Brucella abortus* que correspondem a uma multiplicidade de infecção de 1000 (MOI 1000:1) (Carvalho-Neta et al., 2008). Após a infecção as placas contendo os explantes foram centrifugadas por 15 minutos a 1000 xg e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por trinta minutos para a internalização das bactérias.

Após o tempo de incubação, retirou-se o inóculo de cada explante substituindo-o por meio RPMI 1640 suplementado com 50 µg de gentamicina/mL (Invitrogen - USA) para eliminação de bactérias extracelulares. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂ por 1 h e após esse tempo os explantes foram lavados três vezes com meio RPMI 1640 para eliminação de resíduos do antibiótico.

Após a lavagem, foi acrescentado meio RPMI 1640 enriquecido e novamente as placas foram incubadas a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Nesse ensaio foi analisado o tempo de 4 horas pós-infecção (h.p.i), cada grupo (controle e infectado) em triplicatas. Os explantes do grupo controle foram inoculados com meio RPMI 1640 enriquecido estéril e mantidos nas mesmas condições indicadas anteriormente.

4.2.3 Extração de RNA e confecção de cDNA

O RNA total das células trofoblásticas controle e infectadas com a amostra de *B. abortus* foi extraído pela adição de TRIzol Reagent[®] na superfície dos explantes, que corresponde ao epitélio trofoblástico, como descrito anteriormente. A pureza e concentração do RNA total extraído foram verificadas por espectrofotometria e a qualidade do RNA avaliada por eletroforese em gel de agarose/formaldeído. As amostras de RNA foram então armazenadas a -80° C. A confecção de cDNA foi feita usando o kit TaqMan *Reverse Transcription Reagents*, seguindo as especificações do

fabricante e usando uma concentração de 500 ng de RNA em uma reação com volume final de 20 μ L. O cDNA foi estocado a -20°C.

4.2.4 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A determinação quantitativa dos níveis de transcrição dos genes de interesse foi feita por PCR em tempo real (qRT-PCR) usando o kit SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems – USA) e o termociclador da Applied Biosystems modelo 7500. Os iniciadores usados estão descritos na Tabela 1. Os resultados foram obtidos em valores de limiar de detecção (Ct - *cycle threshold*).

Tabela 1. Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto	Sequência referência NCBI	de Referência no
MHC-I genérico	GGCTACGTGGACGACACG CCCTCCAGGTAGTTCCT	410	NM_001105651.1	Birch et al., 2006
MICB	AGAAAGGAGGCTTACATTCCC GCCTGGTAATGCTTGCTTAAC	199	NM_001127317	Shu et al., 2012
NC1	AGTATTGGGATCAAGAGACGC ATAGGCGTGCTGATTATACCC	181	BC109706	Shu et al., 2012
NC3	AGATGACACGAGATGCCAAG TCG TTCAGGGCGATGTAA	198	DQ140378	Shu et al., 2012
GAPDH	GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG GCTGACAATCTTGAGGGTGTG	195	NM_001034034.2	Davies et al., 2006

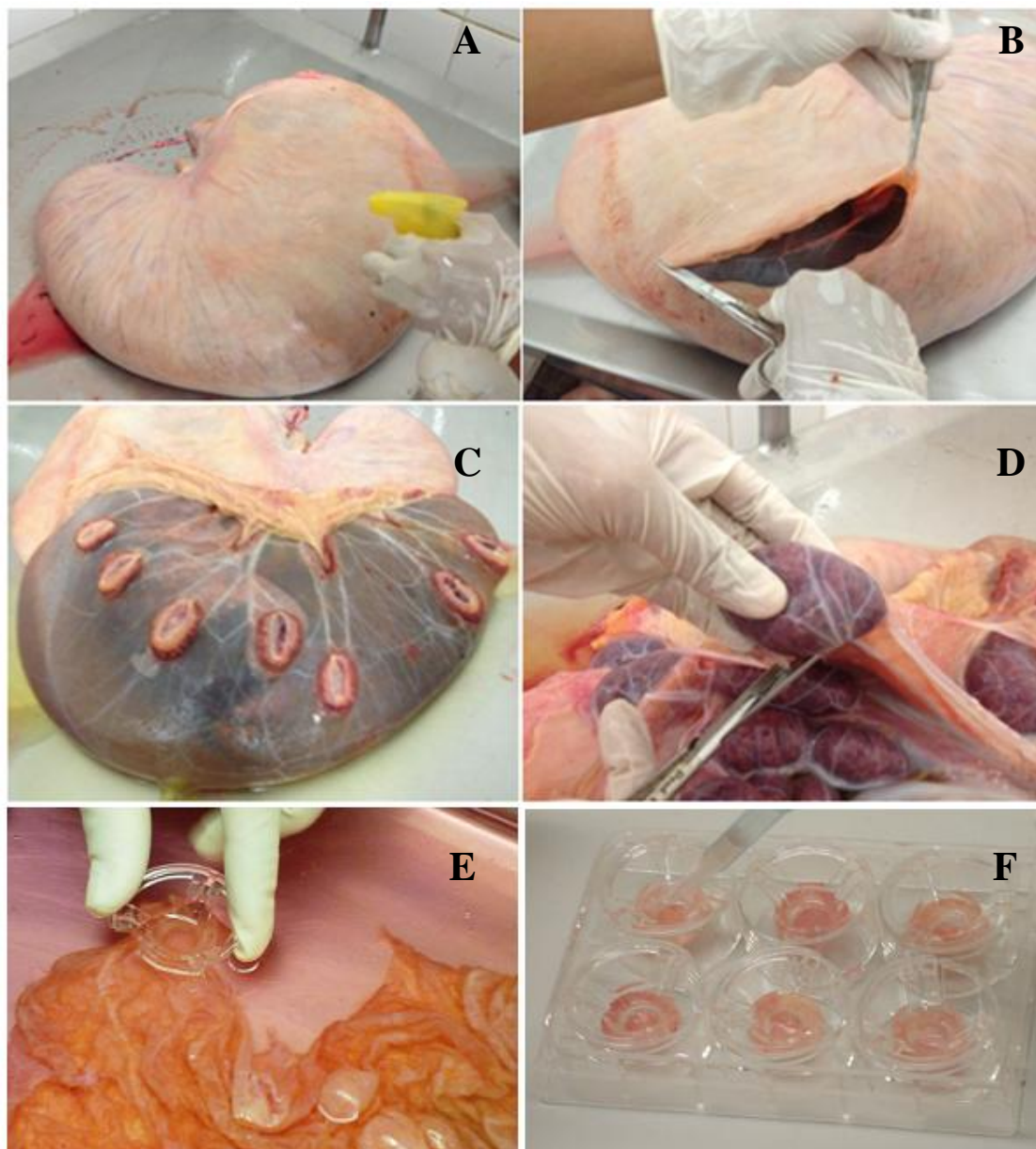


Figura 3. Demonstração da colheita de material. Assepsia do útero gestante (A), abertura do corno uterino gestante (B). Exposição da membrana corioalantóidea (C). Retirada de um fragmento do placentoma (D). Preparação dos explantes da membrana corioalantóidea (E). Preparação da placa de cultivo dos explantes para inoculação com *B. abortus* (F).

4.3 Análise estatística

Todos os valores de Ct normalizados sofreram transformação logarítmica e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias dos grupos de diferentes terços gestacionais foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls (SNK) e as médias dos diferentes tecidos da placenta no mesmo terço de gestação foram comparadas pelo teste t de Student (Graphpad Prism 5.0, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão MHC I não clássico na placenta bovina

Para caracterizar a expressão de MHC-I não clássico na placenta bovina durante a gestação, utilizou-se o RT-PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) com RNA total extraído do placentoma e da região intercotiledonária para amplificação dos genes MHC-I genérico, MICB, NC1e NC3. A expressão dos MHC-I não clássicos (MICB e NC3) diferiu significativamente entre diferentes regiões da placenta bovina ($p < 0,05$), com níveis mais elevados de expressão nas áreas intercotiledonárias, quando comparado ao placentoma. Na região intercotiledonária, nota-se variação significativa na expressão do MICB (Figura 4) e NC3 (Figura 5) ao longo dos três trimestres de gestação. A expressão do MICB varia entre o segundo e o terceiro trimestre ($p < 0,05$), sendo mais intensamente expresso no segundo trimestre. O NC3 apresentou níveis mais elevados de expressão nos últimos dois trimestres.

O gene NC1 apresentou níveis de expressão comparáveis em ambos os tecidos, porém baixos (Figura 6). Em relação ao primer genérico (Figura 7), Bov 1 e 7, que amplifica uma sequência de MHC-I clássico e alelos não clássicos do locus NC1, houve

baixa expressão tanto na região intercotiledonária quanto no placentoma, semelhante ao gene NC1.

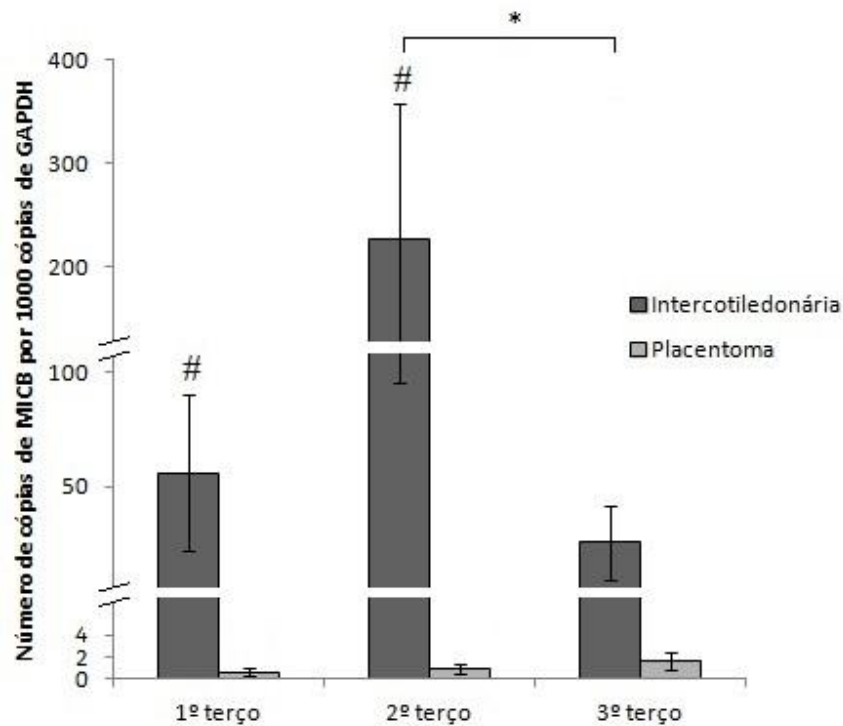


Figura 4. Expressão de MHC de classe I não clássica (MICB) no placentoma e região intercotiledonária em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro terços da gestação). Colunas representam média aritmética ($n = 6$) e erro padrão. *Indica diferença estatística significativa entre os diferentes terços gestacionais ($p < 0,05$). #Indica diferença estatisticamente significativa na transcrição de NC3 em diferentes tecidos da placenta no mesmo terço de gestação ($p < 0,05$).

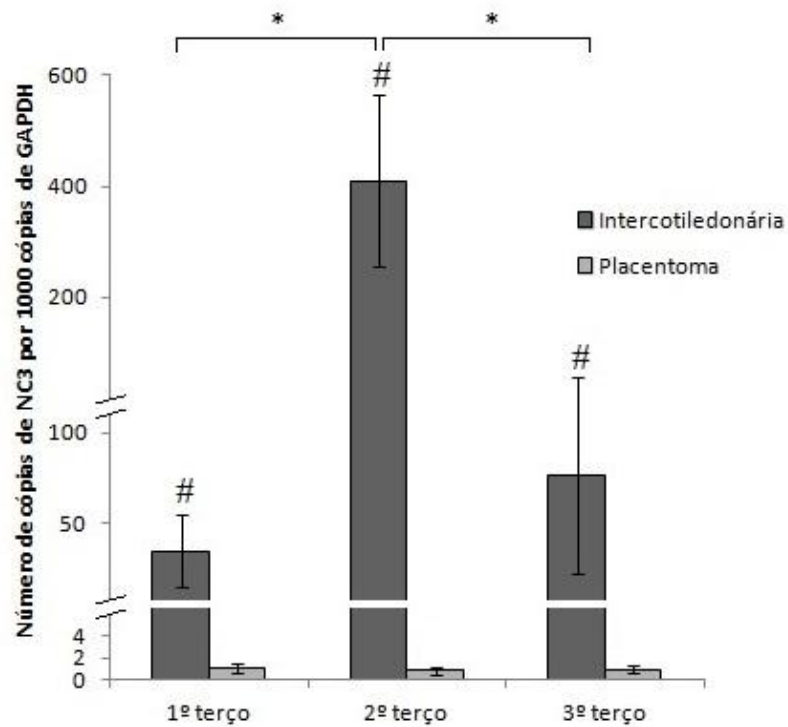


Figura 5. Expressão de MHC de classe I não clássica (NC3) no placentoma e região intercotiledonária em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro terços da gestação). Colunas representam média aritmética ($n = 6$) e erro padrão. *Indica diferença estatística significativa entre os diferentes terços gestacionais ($p < 0,05$). #Indica diferença estatisticamente significativa na transcrição de NC3 em diferentes tecidos da placenta no mesmo terço de gestação ($p < 0,05$).

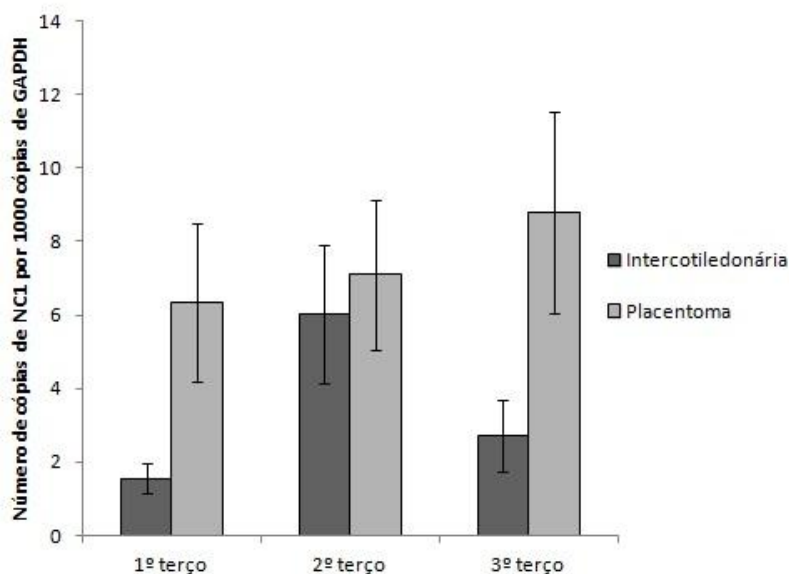


Figura 6. Expressão de MHC de classe I não clássica (NC1) no placentoma e região intercotiledonária em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro terços da gestação). Colunas representam média aritmética ($n = 6$) e erro padrão.

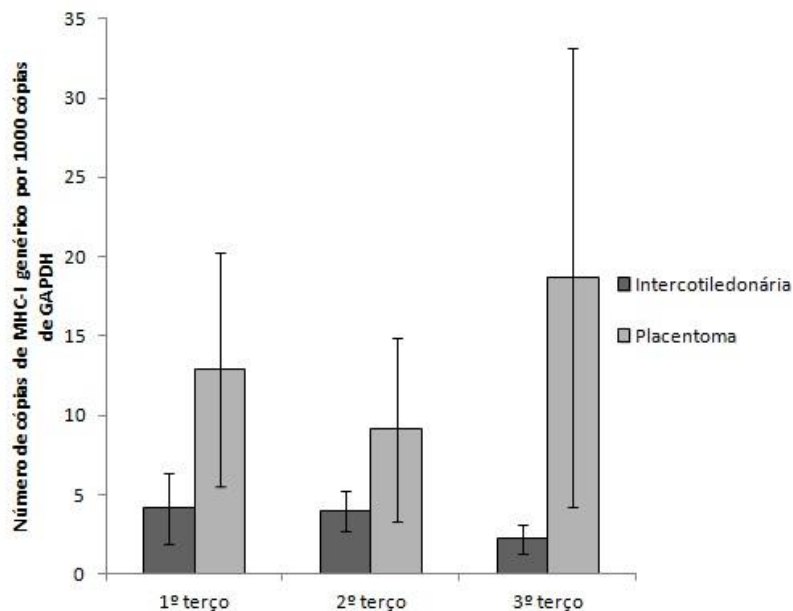


Figura 7. Expressão de MHC de classe I genérico no placentoma e região intercotiledonária em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro terços da gestação). Colunas representam média aritmética ($n = 6$) e erro padrão.

5.2 Perfil de MCH I não clássico em explantes trofoblastos bovinos infectados com *Brucella abortus*

Na avaliação do perfil de expressão de MHC de classe I não clássico em trofoblastos bovinos oriundos da região intercotiledonária da placenta no último trimestre de gestação infectados com *B. abortus*, os resultados de qRT-PCR demonstram aumento na expressão dos genes avaliados quando comparados ao grupo controle não infectado (Figura 8).

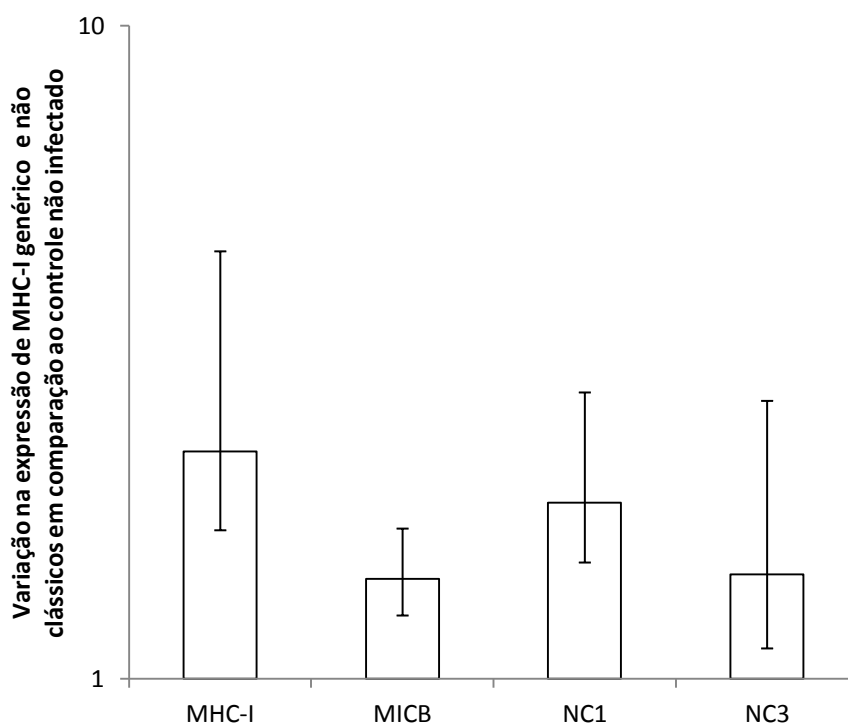


Figura 8. Expressão de MHC de classe I clássico (MHC-I genérico) e não clássico (MICB, NC1 e NC3) em células trofoblásticas bovinas 4 horas após infecção com *Brucella abortus*. As variações nos níveis de transcrição de cada gene avaliados foram obtidas em relação ao grupo controle não infectado. Colunas representam média geométrica (n = 5) e erro padrão.

6 DISCUSSÃO

A transcrição de MHC de classe I foi avaliada anteriormente na placenta bovina (Shu et al., 2012; Davies et al., 2000; 2006), mas este é o primeiro estudo a caracterizá-lo em sua forma não clássica em diferentes regiões da placenta e em vários estágios da gestação. Além disso, a transcrição de MHC-I não clássico foi avaliada após a infecção com *Brucella abortus*, demonstrando a influência da bactéria induzindo aumento na expressão desses genes relacionados aos mecanismos de resposta imune.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que os genes MICB e NC3 foram expressos em níveis elevados em células trofoblásticas da região intercotiledonária de bovinos. Em estudos com camundongos, as células trofoblásticas expressam MHC-I não clássico para inibir a ativação de células NK, evitando a lise de células fetais devido à baixa expressão de moléculas clássicas de MHC (Bulmer et al., 1984; Heemskerk et al., 2005).

No placentoma foram observados níveis extremamente baixos na expressão de todos os genes avaliados, MHC-I genérico, MICB, NC1 e NC3. Resultados semelhantes obtidos por Ellis et al. (1998), ao avaliar a expressão de genes de MHC de classe I em placentoma bovino, mostraram baixos níveis de RNAm na célula trofoblástica. Estudos realizados no mesmo tecido por Silva et al. (2012), caracterizando a expressão dos TLR1-10, NOD1, NOD2 e MD2 no útero bovino, observaram que o placentoma apresentou mínima expressão desses genes, demonstrando assim, do ponto de vista da imunidade inata, que esta região tende a apresentar condição de imunossupressão compatível com a gestação.

Na avaliação da expressão do MICB durante os três períodos gestacionais propostos (1º, 2º e 3º trimestre), foi observada elevação da expressão no segundo trimestre de gestação, seguido por uma diminuição no último trimestre de gestação.

Peng et al. (2011), avaliando a expressão de MICB em tecido placentário coletado no periparto e neutrófilos do sangue periférico de vacas durante a gestação, observaram que houve baixa expressão de MICB na placenta e redução na expressão de MICB em neutrófilos no primeiro e segundo trimestre de gestação, o que não ocorreu no terceiro trimestre. Esse resultado destaca comportamentos diferenciados nos diferentes tecidos avaliados nesse trabalho.

Embora MIC tenha um efeito importante na resposta imune alogênica ou proteção durante a gestação em seres humanos, não há atualmente nenhum dado funcional relativo ao bovino, acredita-se que devido à sua grande semelhança com MIC humano, o MIC bovino desempenhe um papel equivalente ao MIC humano (Birch et al., 2008b; Peng et al., 2011).

O gene NC1 apresentou mínima expressão em ambos os tecidos estudados nos três trimestres de gestação. Semelhante a este resultado, Shu et al. (2012) avaliando transcrição de MHC-I clássicos e não clássicos na placenta bovina, observou baixos níveis de expressão de NC1. A função dos genes de MHC de classe I não clássicos bovino permanece desconhecida. No entanto, tem sido sugerido que o gene NC1, o qual tem um grande número de variantes de splicing (Birch et al., 2008a), pode codificar ambas as formas de proteínas, ligadas à membrana e solúveis, e, assim, influenciar imunotolerância em bovinos (Davies et al., 2006).

A superexpressão do gene NC3, em todos os estágios de gestação na região intercotiledonária, observada neste trabalho, está de acordo com o descrito por Shu et al. (2012), que mostrou elevada expressão do gene nos tecidos fetal e placentário no último trimestre de gestação. O autor sugere que este gene pode atuar como um inibidor da resposta imune materna e da autoimunidade fetal. Além disso, acredita-se que a transcrição diferencial dos genes clássicos, provavelmente, atua sinergicamente com o

gene não clássico NC3, em um mecanismo de proteção imunológica para a vaca gestante.

Nos resultados de expressão gênica diferencial após infecção com *B. abortus*, as células trofoblásticas infectadas por 4 horas *in vitro* apresentaram aumento na expressão dos genes MHC-I genérico, MICB, NC1 e NC3, em relação ao grupo controle não infectado. As moléculas não clássicas de MHC-I do bovino são, provavelmente, homólogas ao HLAG humano, e atuam como ligantes para receptores inibitórios codificados no complexo natural killer (Shiroish et al., 2003; LeMaout et al., 2004; Parham, 2005). Dessa forma, o aumento da expressão de tais genes inibe a ação das células NK, impedindo uma resposta inflamatória em fases precoces da infecção por *Brucella abortus*. Tem sido demonstrado que *B. abortus* é capaz de modular a resposta imune inata de células trofoblásticas bovina por supressão da expressão de genes pró-inflamatórias nas fases iniciais da infecção (Carvalho Neta et al., 2008), sendo esse mecanismo ativo e dependente do sistema de secreção do tipo IV da *Brucella* spp. (Mol et al., 2014). Cabe destacar que o desencadeamento da placentite neutrofílica aguda observada durante infecção por *B. abortus* (Poester et al., 2013) é causado por um aumento na expressão de quimiocinas pró-inflamatórias em fases posteriores da infecção, ou seja, 12 h após a inoculação (Carvalho Neta et al., 2008). Em contraste, na infecção pelo papilomavírus bovino 4 (BPV-4), os genes de MHC-I clássicos são regulados negativamente pelo vírus, entretanto, o BPV-4 não possui nenhum efeito sobre o gene não clássico NC1 (Araibi et al., 2006). Portanto, a interação de agentes infecciosos com genes da resposta imune, como MHC de classe I, varia de acordo com a patogênese da infecção ou doença em questão.

7 CONCLUSÕES

Os genes de MHC de classe I não clássicos são expressos em diferentes estágios e em diferentes tecidos da placenta bovina. A transcrição desses genes varia nos tecidos estudados, com alta transcrição de NC3 e MICB na região intercotiledonária, enquanto há baixa transcrição dos genes estudados no placentoma. Além disso, a região intercotiledonária é responsiva à infecção com *B. abortus*, que resulta em aumento na transcrição dos genes estudados.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N. & SZYFRES, B., 2001. *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales*. Volumen I. Bacteriosis y Micosis. Washington: OPAS.

ANDERSON, T. D., MEADOR, V. P., CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and Histologic Lesions. *Vet Pathol*, v. 23, p. 219-226, 1986.

ANDERSSON, L.; BOHME, J.; PETERSON, P.A.; RASK, L. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes: polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. *Anim Genetics*, v.17, p.295-304, 1986.

ANDERSSON, L.; LUNDEN, A.; SIGURDARDOTTIR, S.; DAVIES, C.J.; RASK, L. Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. *Immunogenetics*, v.27, p.273-280, 1988.

ANTCZAK, D.F. Structure and function of the major histocompatibility complex in domestic animals. *JAVMA*, v. 181, n. 10, p. 1030-1036, 1982.

ARAIBI, E.H.; MARCHETTI, B.; DORNAN, E.S.; ASHRAFI, G.H.; DOBROMYLSKYJ, M.; ELLIS, S.A.; CAMPO, M.S. The E5 oncoprotein of BPV-4 does not interfere with the biosynthetic pathway of non-classical MHC class I. *Virology* v. 353, p. 174–183, 2006.

ATKINSON, B.A.; KING, G.J.; AMOROSO, E.C. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod*, v. 30, p. 763-774, 1984.

BAHRAM, S.; BRESNAHAM, M.; GERAGHTY, D.E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 91, p. 6259–6263, 1994.

BARQUEIRO-CALVO, E.; CHAVESOLARTE, E.; WEISS, D. S.; GUZMÁNVERRI, C.; CHACON-DIAZ, C.; RUCAVADO, A.; MORIYON, I.; MORENO, E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS*, v. 7, p. 631, 2007.

BEER, A.E.; BILLINGHAM, R.E. Host responses to intra-uterine tissue, cellular and fetal allografts. *J Reprod Fertil Suppl*, v. 21, p. 59-88, 1974.

BIRCH, J., MURPHY, L., MACHUGH, N. D., ELLIS, S. Generation and maintenance of diversity in the cattle MHC Class I region. *Immunogenetics*, v. 58, n. 8, p. 670-679, 2006

BIRCH, J.; CODNER, G.; GUZMAN, E.; ELLIS, S. Genomic location and characterisation of nonclassical MHC class I genes in cattle. *Immunogenetics*, v. 60, p. 267-273, 2008a.

BIRCH, J.; DE JUAN SANJUAN, C.; GUZMAN, E.; ELLIS, S. Genomic location and characterisation of MIC genes in cattle. *Immunogenetics*, v. 60, p. 477-483, 2008b.

BOYSEN, P.; STORSET, A.K. Bovine natural killer cells. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 130, p. 163–177, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Saúde Animal, 2006. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) – Manual Técnico*. Brasília: MAPA / DAS / DSA, 2006, 188p.

BULMER, J.N., BILLINGTON, W.D., JOHNSON, P.M. Immunohistologic identification of trophoblast populations in early human pregnancy with the use of monoclonal antibodies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* v. 148, n. 1, p. 19-26, 1984.

CARVALHO NETA, A.V.; STEYNEN, A. P. R.; PAIXAO, T. A.; MIRANDA, K. L.; SILVA, F. L.; ROUX, C. M.; TSOLIS, R. M.; LEWIN, H. A.; ADAMS, L. G.; CARVALHO, A. F.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Modulation of bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, v. 76, p. 1897-1907, 2008.

CARVALHO NETA, A. V.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, p. 1-10, 2009.

CODNER, G. F. *Assessing MHC class I diversity in dairy cattle populations*. PhD thesis, University of Glasgow, 2010.

COLLINS, R.W.M. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet*, v. 31, p. 105–114, 2004.

CRESSWELL, P. Assembly, transport, and function of MHC Class-II molecules. *Annual Review of Immunology*, v. 12, p. 259-293, 1994.

DAVIES, C.J.; ANDERSSON, L.; ELLIS, S.A.; HENSEN, E.J.; LEWIN, H.A.; MIKKO, S.; MUGGLI-COCKETT, N.E.; VAN DER POEL, J.J.; RUSSELL, G.C. Nomenclature for factors of the BoLA system, 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim Genetics*; 28:159-168, 1997.

DAVIES, C. J. Why is the fetal allograft not rejected? *J Anim Sci*, v. 85, p. E32-E35, 2007.

DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFER, D. H. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. *Placenta*, v. 21, p. 194–202, 2000.

DAVIES, C. J.; ELDRIDGE, J. A.; FISHER, P. J.; SCHLAFER, D. H. Evidence for expression of both classical and non-classical major histocompatibility complex class I genes in bovine trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol*, v.55, p.188–200, 2006.

DOUBROVINA, E. S.; DOUBROVIN, M. M.; VIDER, E.; SISSON, R. B.; O'REILLY, R. J.; DUPONT, B.; VYAS, Y. M.. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol.* v. 171, p. 6891-6899, 2003.

DONALDSON, W.L.; ZHANG, C.H.; ORIOL, J.G.; ANTCZAK, D.F. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. *Development*, v. 110, p. 63-71, 1990.

DUELLO TM, BYATT JC, BREMEL RD. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology*, v. 119, p. 1351-1355, 1986.

DUENAS, A. I.; ORDUNA, A.; CRESPO, M. S.; GARCIA-RODRIGUEZ, C. Interaction of endotoxins with Toll-like receptor 4 correlates with their endotoxic potential and may explain the proinflammatory effect of *Brucella* spp. LPS. *Int. Immunol.* v. 16, p. 1467-1475, 2004.

ELLIS, S.A., SARGENT, I.L., CHARLESTON, B., BAINBRIDGE, D.R.J. Regulation of MHC class I gene expression is at transcriptional and post-transcriptional level in bovine placenta. *Journ Reprod Immun*, v. 37, p. 103–115, 1998.

GARCÍA, G.; DEL PUERTO, F.; PÉREZ, A.B.; SIERRA, B.; AGUIRRE, E.; KIKUCHI, M.; SÁNCHEZ, L.; HIRAYAMA, K.; GUZMÁN, M.G. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Hum Immunol.* v. 72, n. 10, p. 904-7, 2011.

GOGOLIN-EWENS, K. J.; LEE, C. S.; MERCER, W. R.; BRANDON, M. R. Site-directed differences in the immune response to the fetus. *Immunology*, v. 66, p. 312-317, 1989.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.*, v. 90, p. 281-297, 2002.

GROH, V.; WU, J.; YEE, C.; SPIES, T. Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, v. 419, p. 734–738, 2002.

HEEMSKERK, B., LANKESTER, A.C., VAN VREESWIJK, T., et al. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J. Infect. Dis.* v. 191, n. 4, p. 520-530, 2005.

HOLMES, M.A.; LI, P.; PETERSDORF, E.W.; STRONG, R.K. Structural studies of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stressinducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *J Immunol*, v. 169, p. 1395–1400, 2002.

HUNT, J. S.; ANDREWS, G. U.; WOOD, G. W. Normal trophoblasts resist induction of class I HLA. *J immunology*, v. 138, p. 2481-2487, 1987.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; McINTIRE, R. H.; OBER, C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*, v. 19, p. 681-693, 2005.

HUNT, J.S. Stranger in a strange land. *Immunol Rev*, v. 213, p. 36–47, 2006.

ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:3947-3951, 1992

JOOSTEN, I.; SANDERS, M.F.; HANSEN, E.J. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the etiology of bovine retained placenta. *Anim Genet*, v. 22, p. 455-463, 1991.

KELLEY, J.; WALTER, L.; TROWSDALE, J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics*, v. 56, p. 683-695, 2005.

KLEIN J. *Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex: principles of immunogenetics applied to a single system*. Berlin and New York: Springer-Verlag; 1975.

KLEIN, J. H-2 mutations: their genetics and effect on immune functions. *Adv Immunol*; v. 26, n. 55, p. 146, 1978.

KLEIN, J. The major histocompatibility complex of the mouse. *Science*, v. 203, n. 4380, p. 516-521, 1979

KLISCH, K.; WOODING, F.B.; JONES, C.J. The glycosylation pattern of secretory granules in binucleate trophoblast cells is highly conserved in ruminants. *Placenta*, v. 31, p. 11-17, 2010.

LEE, C.S.; MEEUSEN, E.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M.R. Quantitative and qualitative changes in the intraepithelial lymphocyte population in the uterus of nonpregnant and pregnant sheep. *Am. J Reprod Immunol*, v. 28, p. 90-96, 1992.

LeMAOULT, J.; KRAWICE-RADANNE, I.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. HLA-G expressing antigen presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *PNAS*, v. 101, p. 7064-7069, 2004.

LEWIN, H.A. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. In: Schook LB, Lamont SJ (eds.), *The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species*. Florida: CRC Press; p. 65-98, 1996.

LIVAK, J.; SCHMITTGEN, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2\Delta\Delta C_t$ Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001

MAJEWSKI, A.C.; HANSEN, P.J. Progesterone promotes survival of xenogeneic transplants in the sheep uterus. *Horm Res*. v. 58, p. 128-135, 2002;

MINCHEVA-NILSSON, L.; NAGAEVA, O.; CHEN, T.; STENDAHL, U.; ANTSIFEROVA, J.; MOGREN, I.; HERNESTÅL, J.; BARANOV, V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol*. v. 176, p. 6, p.3585-92, 2006.

MIR, S.A.; SHARMA, S. Role of MHC class Ib molecule, H2-M3 in host immunity against tuberculosis. *Vaccine*. v.31, n. 37, p. 3818-25, 2013.

MOL, J.P.S.; COSTA, E.A.; CARVALHO, A.F. et al. Early transcriptional responses of bovine chorioallantoic membrane explants to wild type, virB2 or btpB *Brucella abortus* infection. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, e108606, 2014.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. *Embriologia básica*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MUNSON, L.; WILHITE, A.; BOLTZ, V.F.; WILKINSON, J.E. Transforming growth factor beta in bovine placentas. *Biol Reprod*, v. 55, p. 748-755, 1996.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRS in human history, health and survival. *Nat Ver Immunol*, v. 5, p. 201-214, 2005.

PENG, X.L.; ZHANG, S.; DENG, G.Z.; LI, B.B; WU, Y.; HE, M.Y.; WANG, X.; LI, C.Y.; QIU, C.W.; ZHNAG, K.C. Differential expression of bovine leucocyte antigen class I chain-related genes 2 in preganant dairy cows and neonatal calves. *J Anim Vet Adv*. v. 10, p. 2996-3001, 2011.

POESTER, F.P.; SAMARTINO, L.E.; SANTOS, R.L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev. Sci. Tech.* v. 32, p. 105-115, 2013.

RAHMAN, A.N.M.A. Hormonal changes in the uterus during pregnancy- lessons from the ewe: a review. *J Agric Rural Dev*, v. 4, n. 1&2, p. 1-7, 2006.

RICHARDSON, C. personal communication in: ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E.; PEARSON, H. *Vet. Reprod obstet*, v. 6, p. 49-59, 1989.

RICHMOND, J. Y.; McKINNEY, R. W. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 3 ed. Washington: Nacional Institutes of Health/Centers for disease control and prevention. p. 85-86, 1993.

RUSSELL, G.C.; DAVIES, C.J.; ANDERSSON, L.; ELLIS, S.A.; HENSEN, E.J.; LEWIN, H.A.; MIKKO, S.; MUGGLI-COCKETT, N.E.; VAN DER POEL, J.J. BoLA class II nucleotide sequences, 1996: report of ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim Genetics*, v. 28, p. 169-180, 1997.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, v. 101, p. 455-458, 2000.

SALIH, H. R., H. G. RAMMENSEE, A. STEINLE. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* v. 169, p. 4098-4102, 2002.

SALIH, H.R.; ANTROPIUS, H.; GIESEKE, F.; LUTZ, S. Z.; KANTZ, L.; RAMENSEE, H. G.; STEINLE, A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, v. 102, p. 1389-1396, 2003.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. Interaction of bovine chorioallantoic membrane explants with three strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n.3, p. 359-363, 1992.

SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 19, p. 55-63, 1996.

SANTOS, R. L.; MARQUES JUNIOR, A. P. Morfofisiologia da Placenta Bovina. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n. 15, p. 27, 1996.

SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci* v. 60-61, p. 145-160, 2000.

SCOTT, P.C.; CHOI, C.L.; BRANDON, M.R. Genetic organization of the ovine MHC class II region. *Immunogenetics*; v. 25, p. 116-122, 1987.

SHIROISH, M.; TSUMOTO, K.; AMANO, K.; SHIRAKIHARA, K.; COLONNA, M.; BRAUD, V. M.; ALLAN, D. S.; MAKADZANGE, A.; ROWLAND, J. S.; WILLCOX, B.; JONES, E. Y.; VAN DER MERWE, P. A.; KUMAGAI, I.; MAENAKA, K. Human inhibitory receptors IgG-like transcript (ILT2) and ILT4

compet with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA G. *PNAS*, v. 100, p. 8856-8861, 2003.

SHU, L.; PENG, X.; ZHANG, S.; DENG, G.; WU, Y.; HE, M.; LI, B.; LI, C.; ZHANG, K. Non-classical major histocompatibility complex class makes a crucial contribution to reproduction in the dairy cow. *J Reprod Dev.* v. 58, n. 5, p. 569-75, 2012.

SILVA, A.P.C, COSTA, E.A., MACÊDO, A.A., MARTINS, T.M., BORGES A.M., PAIXÃO, T.A., SANTOS, R.L. Transcription of pattern recognition receptors and abortive agents induced chemokines in the bovine pregnant uterus. *Vet Immunol Immunop*, v.145, p.248– 256, 2012.

SPOONER, R.L.; LEVEZIEL, H.; GROSCLAUDE, F.; OLIVER, R.A.; VAIMAN, M. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *J Immunogenetics*, v. 5, p. 325- 346, 1978.

SPOONER, R.L.; MILLAR, P.; OLIVER, R.A. The production and analysis of antilymphocyte sera following pregnancy and skin grafting of cattle. *Anim Blood Groups and Biochem Genetics*, v. 10, p. 99-105, 1979.

SVEJGAARD, A.; HAUGE, M.; JERSILD, C.; PLATZ, P.; RYDER, L.P.; NIELSEN, L.S.; THOMSEN, M. The HLA system. An introductory survey. *Monogr Hum Genet*, v. 7, p. 1-100, 1975.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Fiocruz-RJ. 362p., 1996.

TIZARD, I.R. MHC: Receptores apresentadores de antígenos. In: _____. *Imunologia veterinária: uma introdução*. São Paulo: Roca, 2002. p. 51-63.

TROWSDALE, J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*, v. 15, n. 3, p. 363-374, 2001.

TYSOE-CALNON, V.A.; GRUNDY, J.E.; PERKINS, S.J. Molecular comparisons of the β 2-microglobulin-binding site in class I major-histocompatibility-complex alpha-chains and proteins of related sequences. *Biochem J*, v. 277, p. 359-369, 1991.

VAN EIJK, M.J.; RUSS, I.; LEWIN, H.A. Order of bovine DRB3, DYA, and PRL determined by sperm typing. *Mammalian Genome*, v. 4, n. 2, p. 113-118. 1993.

XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathology, immunohistochemistry, and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J Comp Pathol*, v. 140, n. 3-4, p.147- 157, 2009.

WOODING, F.B.P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, v. 13, p. 101-113, 1992.

WOODING, F.B.P.; ROBERTS, R.M.; GREEN, J.A. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta*, v. 26, p. 807-827, 2005.

ZINKERNAGEL, R.; DOHERTY, P. H-2 compatability requirement for T-cellmediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. *J Exp Med*, v. 141, p. 1427-1436, 1975.