



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TAYNAN DULCE DA SILVA ROSA

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL
NA ESPERMATOGÊNESE BOVINA**

São Luís

2016

TAYNAN DULCE DA SILVA ROSA

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL
NA ESPERMATOGÊNESE BOVINA**

Monografia apresentada a Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta

São Luís

2016

Rosa, Taynan Dulce da Silva

Expressão do complexo de histocompatibilidade principal na espermatogênese bovina/Taynan Dulce da Silva Rosa – São Luís, 2016.

51 f

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientador: Profª Drª Alcina Vieira de Carvalho Neta

TAYNAN DULCE DA SILVA ROSA

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL
NA ESPERMATOGÊNESE BOVINA**

Monografia apresentada a Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Alcina Vieira de Carvalho Neta, Dsc – UEMA

(Orientadora)

Prof. Ferdinan Almeida Melo, Dsc – UEMA

1º membro

Msc. Larissa Sarmiento dos Santos Ribeiro

(Msc. Ciência Animal – UEMA/Doutoranda BIONORTE –UFMA)

2º membro

A minha amada avó Maria José Garcia da Silva,

sinto tanto a sua falta minha Vózinha.

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, dono da minha vida, por guiar meus passos durante toda essa caminhada. Pai, tudo que tenho e sou é graças ao Senhor.

Aos meus Pais, Maria Cleudes e Cláudio Rosa, vocês são a minha base, minha força, meu tudo! Obrigada por me ensinarem os valores essenciais pra vida e principalmente por serem os melhores pais do mundo. Amo vocês mais que tudo!

Ao meu irmão Ruan Cláudio, obrigada por todo amor e carinho dedicados a mim, sei que poderei contar contigo sempre. Amo você!

Ao meu melhor amigo, meu namorado Thiago Rocha, a toda paciência, carinho, cumplicidade e principalmente todo o amor depositado a mim, te amo vida!

Agradeço a minha querida orientadora, minha mãe científica, professora Alcina, por todos os ensinamentos, confiança e até pelos puxões de orelha, com a senhora me tornei uma pessoa muito melhor, o meu muito obrigada por tudo!

Agradeço a família LPMOL por ter me acolhido de braços abertos e contribuído imensamente na minha formação acadêmica, além de e me ensinar muito em todos os sentidos. Meu muito obrigado a toda equipe.

Às amigas Larissa Sarmiento, Daniele Rosa e Ellainy Maria, amigas que conquistei durante três anos de LPMOL, obrigada pelos ensinamentos repassados, pela paciência, confiança e por todos os momentos que passamos juntas. A vocês todo meu carinho.

Aos meus amigos e companheiros da madrugada, Gabriel Xavier e Thaís Bastos. Cada dia cansativo e cada noite sem dormir com vocês ao meu lado eram sempre mais divertidos. Sei que posso contar com a amizade e apoio de vocês sempre.

As minhas amigas irmãs Carolina Torres e Rayule Cristina, companheiras de todos os dias. Com vocês me tornei uma pessoa melhor, até passei de bruta para uma pessoa meiga e fofa (hahahaha). Amo vocês minhas meninas e levarei pra sempre no meu coração.

Aos meus amigos que fiz durante a graduação, Pablo Sousa, Thaís Lara, Izabelly Mesquita, Julie Emanuelle e Luara Pinho. Vocês são os melhores, obrigada por tudo

que passamos juntos, foram cinco anos que irei guardar pra sempre na memória e no coração.

A todos meus familiares e amigos que contribuírem de forma direta ou indireta na minha formação. A vocês o meu muito obrigado!

Ao CNPq pela concessão da bolsa e a UEMA por toda estrutura para realização do projeto.

“Até aqui nos ajudou o Senhor!”

(Samuel 7.12)

RESUMO

Existem dois grupos de MHC de classe I, clássicos e não clássicos. Pouco se sabe sobre os genes de MHC classe I não clássico (MHC-Ib) quanto a sua função imunológica na reprodução, principalmente no sistema reprodutor masculino de bovinos, em que MHC-Ib é expresso em tecidos testiculares e no espermatozoide. A capacidade reprodutiva de um macho depende do desenvolvimento espermatogênico normal e funcional formado a partir de uma série de transformações correlacionadas no interior dos testículos. Considerando a hipótese da presença de MHC-Ib no sistema reprodutor masculino de bovinos, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão gênica de MHC-Ib durante a espermatogênese bovina. As coletas das amostras testiculares foram realizadas em abatedouros do município de São Luís, Maranhão, com retirada de fragmentos de parênquima testicular de 36 animais, sendo todas as amostras bilaterais (testículo esquerdo e direito). Após o processamento histológico das amostras, foi realizada a avaliação da espermatogênese utilizando o sistema de pontuação preconizada por Johnsen, onde todas as seções tubulares foram avaliadas sistematicamente e atribuída uma pontuação de 1 a 10 de acordo com a produção espermática. Ao exame microscópico observou-se a variação das notas entre os escores 6, 7 e 8. Para a avaliação molecular, as amostras testiculares foram divididas em três grupos, de acordo com o escore obtido, totalizando 12 amostras/escore. Os dados da análise do qPCR demonstraram que não houve diferença estatística significativa na expressão de MHC-Ib no tecido testicular de bovinos. Nesta pesquisa, a mínima expressão do MHC no testículo bovino dá o direcionamento ao estudo de outras moléculas que podem estar envolvidas no controle e maturação celular ao longo da espermatogênese. Desta forma, se faz necessário a realização de pesquisas adicionais utilizando proteínas e citocinas relacionadas com a diferenciação das células espermáticas para o profundo conhecimento no papel desempenhado por essas na imunidade do animal.

Palavras-chave: espermatogênese, MHC-Ib, qPCR.

ABSTRACT

There are two groups of MHC class I, classical and non-classical. Few things about the non-classical MHC class I genes (MHC-Ib) and their immune function in reproduction, particularly in the male bovine reproductive system, in which MHC-Ib is expressed in the sperm and testicular tissues. The reproductive capacity of a male depends on the normal functional development spermatogenic formed from a series of transformations correlated inside the testicles. Considering the hypothesis of the presence of MHC-Ib in the male bovine reproductive system, this study aimed to assess the gene expression of MHC-Ib during bovine spermatogenesis. The collections of testicular samples were carried out in abattoirs in the city of São Luís, Maranhão, with removal of testicular parenchyma fragments of 36 animals. All samples were bilateral (left and right testicles). After histological processing the samples, it was carried out the evaluation of spermatogenesis using the scoring system devised by Johnsen, where all tubular sections were systematically evaluated and given a score of 1 to 10 according sperm production. Microscopic examination showed the range of scores between the scores 6, 7 and 8. For the molecular evaluation, testicular samples divided into three groups, according to the score, totaling 12 samples/score. The qPCR analysis of the data showed no statistically significant difference in MHC-Ib expression in testicular tissue of cattle. In this study, the minimum expression of MHC in bovine testis gives the direction to the study of other molecules that may be involved in control and cell maturation during spermatogenesis. Thus, it is necessary to carry out further research using proteins and cytokines related to the differentiation of sperm cells to the deep knowledge of the role played by those in the animal's immunity.

Key Words: spermatogenesis, MHC-Ib, qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Corte histológico do parênquima testicular bovino, coloração Hematoxilina e Eosina (40x). A. Túbulo seminífero apresentando espermatogênese incompleta, com ausência de espermátides em alongamento e alongadas. B. Túbulos seminíferos apresentando células espermatogoniais (1), espermátocitos (2) e espermátides arredondadas e em alongamento (3) e espermátides alongadas (4). 35
- Figura 2** – Expressão de MHC de classe I não clássico utilizando gene MICB nos diferentes escores de Johnsen. Colunas representam média aritmética (n = 12) e erro padrão. 38
- Figura 3** – Expressão de MHC de classe I não clássico utilizando gene NC1 nos diferentes escores de Johnsen. Colunas representam média aritmética (n = 12) e erro padrão. 39
- Figura 4** – Expressão de MHC de classe I não clássico utilizando gene NC3 nos diferentes escores de Johnsen. Colunas representam média aritmética (n = 12) e erro padrão. 39
- Quadro 1** – Critérios de avaliação espermática segundo a pontuação de Johnsen. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de avaliação espermática segundo a pontuação de Johnsen.	31
Tabela 2 – Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.	33
Tabela 3 – Quantidade de amostras por escore submetidas a RT-PCR.	37

LISTA DE SIGLAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

ANOVA - Análise de Variância

BoLA - Complexo Antígeno Leucocitário Bovino de Classe I

CD4+ - Cluster of Differentiation 4 – receptor de quimiocina tipo 4

CD8+ - Cluster of Differentiation 8 – receptor de quimiocina tipo 8

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FSH - Hormônio Folículo-Estimulante

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina

HLA - Complexo Antígeno Leucocitário Humano

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LH - Hormônio Luteinizante

MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

MHC - I Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I

MHC-Ib - Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I não clássico

MHC-II Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II

MICB – Gene do complexo MHC Ib

mRNA - RNA mensageiro

NC1 – Gene do complexo MHC Ib bovino

NC3 – Gene do complexo MHC Ib bovino

NK – Célula natural killer

PCR - Reação em cadeia de polimerase

qPCR – PCR quantitativa

RNA - Ácido ribonucleico

TNF - α Fator de necrose tumoral α

TNF - β Fator de necrose tumoral β

UEMA - Universidade Estadual do Maranhão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Bovinocultura	19
2.2 Espermatogênese	19
2.3 Complexo Principal De Histocompatibilidade	23
2.3.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade em bovinos	25
3. OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Local de Estudo	29
4.2 Colheita das Amostras	29
4.3 Processamento Histológico	29
4.4 Classificação da Espermatogênese	30
4.5 Extração de RNA	32
4.6 Síntese de cDNA	32
4.7 PCR Quantitativa (qPCR)	33
4.8 Análise Estatística	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Análise Histológica	35
5.2 Expressão do gene MHC-I não clássico no testículo	37
6. CONCLUSÃO	42
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial (MAPA, 2015). Nas últimas décadas, a abertura de mercados nos mais diversos segmentos do setor agropecuário e, conseqüentemente, o aumento da concorrência por ocasião da comercialização, resultou em mudanças expressivas no perfil dos produtores rurais, no comércio de produtos e nas exigências dos consumidores (MOURA, 2008).

A produção de bovinos no Brasil tem crescido de forma constante nos últimos anos. Na produção de gado de corte, deve-se destacar o manejo reprodutivo como uma condição que contribui sensivelmente para o sucesso na produção desses animais e nesse contexto a fertilidade animal se torna tão importante quanto o crescimento do animal e a qualidade da carcaça (FORMIGONI, 2002).

A capacidade reprodutiva de um macho depende do desenvolvimento espermatogênico normal e funcional, desse modo, é necessário que ocorra uma série de transformações correlacionadas no interior dos testículos que resultam na capacidade reprodutiva do animal. Nos machos, os espermatozoides são produzidos após a puberdade, quando o sistema imunológico já está estabelecido, mas ainda tem de se adaptar e desenvolver a tolerância ativa para auto antígenos de células germinativas masculinas.

Pouco se sabe sobre a influência dos genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) na espermatogênese em bovinos, entretanto, já se sabe que em humanos este é expresso no espermatozoide (CHIANG et al., 1994), na próstata (LANGAT et al., 2006), em tecidos testiculares e no plasma seminal (LARSEN et al., 2011). Yao e colaboradores (2014) demonstraram que há expressão diferencial de mRNA de HLA-G em tecidos testiculares com diferente capacidade espermatogênica. Assim também como em tecidos testiculares e esperma do Macaco-Rhesus (RYAN et al., 2002).

O MHC é um locus que codifica genes de proteínas especializadas, cuja função é apresentar antígenos para serem reconhecidos pelas células T. Existem dois tipos principais de produtos dos genes do MHC, chamados moléculas de classe I e moléculas de classe II (LOW et al., 1990; DAVIES et al., 2006; ABBAS, 2008). As

moléculas classe I são expressas por praticamente todas as células nucleadas e apresentam peptídeos aos linfócitos citolíticos CD8⁺ (CTLs) (LOW et al., 1990; DAVIES et al., 2000; TIZARD, 2004; ABBAS et al., 2008), enquanto as de classe II os apresentam nas células T auxiliaadoras CD4⁺ (ABBAS et al., 2008). Existem dois grupos de MHC de classe I, clássicos (MHC-Ia) e não clássicos (MHC-Ib). 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. As moléculas não clássicas (MHC-Ib) possuem distribuição tecidual e variação genética específicas, atuando como uma importante molécula imunomoduladora, inibindo a atividade citotóxica de células T, células natural killer (NK), a lise e a proliferação celular (ZIDI e BEN AMOR, 2011).

O Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I não clássico (MHC-Ib) é caracterizado por possuir distribuição tecidual e variação genética específicas. Como uma importante molécula imunomoduladora, o MHC-Ib inibe a atividade citotóxica de células T, células “*Natural Killer*” (NK), a lise e a proliferação celular. As moléculas de MHC-Ib também desempenham um papel fundamental na tolerância materno-fetal por citocinas de equilíbrio Th1 / Th2 (ZIDI e BEN AMOR, 2011).

Além da sua função imunológica, a função não imune de MHC-Ib na reprodução tem sido descoberta nos últimos anos. Pouco se sabe a respeito do MHC-I não clássico bovino, mas estudos em humanos e camundongos demonstraram que as isoformas não clássicas desse gene interagem com receptores inibitórios de citocinas ou de células NK para inibir a resposta imune materna (DAVIES et al., 2006). Em bovinos, as células trofoblásticas, na região intercotiledonária da placenta, expressam proteínas de MHC-I clássicas e não clássicas durante o terceiro trimestre de gestação (DAVIES et al., 2000; DAVIES et al., 2006; SANTOS et al., 2015). 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).

Já nos tecidos reprodutivos masculinos do homem, autores descrevem que o HLA-G está presente por dois motivos:

1º) O HLA-G foi detectado em locais imunoprivilegiados, como a placenta e o olho (LE DISCORDE et al., 2003), podendo ser detectado em testículos, por estes

também serem considerados um local imunologicamente privilegiado. A falha em desencadear respostas imunes nestes locais é, em parte devido à presença de citocinas inibitórias, as quais inibem respostas inflamatórias (FIJAK e MEINHARDT, 2006). Dessa forma, sugere-se que o MHC-I não clássico atue nesse tecido inibindo a atividade das células NK.

2º) O plasma seminal parece ter um efeito imunológico na mulher antes da implantação do embrião (ROBERTSON, 2005). Portanto, pode-se supor que moléculas HLA paternos, talvez incluindo HLA-G, no plasma seminal, podem estar envolvidas na indução de tolerância materna aos antígenos paternos. Esta indução de tolerância halogênica às moléculas de HLA paternos no feto pode ser importante para o sucesso da gravidez (LARSEN et al., 2011).

Apesar da conhecida influência do MHC-Ib na espermatogênese em primatas, em bovinos a expressão do MHC-Ib em testículo é desconhecida. No entanto, é provável que o MHC-I não clássico não só é expresso em tecidos reprodutivos masculinos, mas também desempenha um papel importante na regulação da fertilidade masculina, tanto em homens quanto em bovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bovinocultura

O Brasil é atualmente o líder mundial nas exportações de carne bovina e possui o maior rebanho bovino comercial com cerca de 215 milhões de cabeças (IBGE, 2015). Além do mais, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada no mercado internacional e vendas em mais de 180 países. O rebanho bovino brasileiro possibilita o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos. As cadeias produtivas da carne e do leite. O valor bruto da produção desses dois subprodutos, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, demonstram a importância econômica e social da bovinocultura no país (MAPA, 2015).

Atualmente, cerca de 13,5% do rebanho bovino brasileiro se encontra na região Nordeste, sendo 7,53 milhões de cabeças somente no Estado do Maranhão (IBGE, 2015). Aproximadamente 80% do rebanho brasileiro é composto por animais de raças zebuínas (*Bos indicus*), que são animais de comprovada rusticidade e adaptação ao clima tropical predominante encontrado no território nacional. Dentre estas raças, destaca-se a Nelore, com 90% desta parcela (ABIEC, 2016).

As dimensões territoriais do Brasil colaboram para esse resultado, uma vez que favorecem a criação da maioria do gado em pastagens. Fatores como: o investimento em tecnologia e capacitação profissional; o desenvolvimento de políticas públicas, que permitem que o animal seja rastreado do seu nascimento até o abate; o controle da sanidade animal e segurança alimentar contribuíram para que o País atendesse às exigências dos mercados rigorosos e conquistasse espaço no cenário mundial (ABIEC, 2016).

2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo pelo qual as células-tronco multipotentes primitivas se dividem seja para se auto renovar, ou para produzir células filhas resultando na evolução de espermatogônia a espermatozoide. Esse processo ocorre no interior dos túbulos seminíferos, onde as células sofrem uma série contínua de divisões celulares e modificações de desenvolvimento, começando na periferia e progredindo em direção à luz tubular (AGUIAR et al., 2006).

O desenvolvimento da espermatogênese depende do suporte funcional das células de Sertoli (MARTIN-DU PAN e CAMPANA, 1993), dos níveis adequados de esteroides, gonadotrofinas e de fatores de crescimento (SHARPE, 1994). As gonadotrofinas controlam a proliferação e a diferenciação das células de Sertoli e Leydig desde a fase pós-natal, de modo que os esteroides e fatores de crescimento secretados por estas células têm ação direta ou indireta sobre o desenvolvimento das células germinativas (AGUIAR et al., 2006).

Durante sua evolução, a espermatogênese pode ser dividida em três fases: (1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas formando os espermatócitos primários. Nessa fase todas as células são diplóides; (2) fase meiótica ou espermatocitogênica, onde o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinado e segregado através da meiose formando os espermatócitos secundários e em seguida as espermatídes. Esta fase é de grande importância para a diversidade genética entre membros da mesma espécie; (3) e fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual células haplóides, as espermatídes, se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os oócitos, os espermatozoides (RUSSELL et al., 1990).

2.2.1 Controle Neuroendócrino na Espermatogênese

O processo do desenvolvimento e maturação sexual em touros envolve um complexo mecanismo do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. A função testicular normal requer estimulação hormonal pelas gonadotrofinas, estas são controladas por secreções pulsáteis de hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo (HPT). Outros hormônios (prolactina, hormônio do crescimento e hormônio estimulante da tireóide) podem apresentar papéis secundários no suporte à função testicular embora não existam evidências que comprovem tal fato (SCHANBACHER, 1984).

Na espécie bovina, o início da puberdade está associado à habilidade das células de Leydig em responder ao estímulo do Hormônio Luteinizante (LH (BOOCKFOR et al., 1983), produzindo crescentes quantidades de testosterona, que, por sua vez, controla a diferenciação das células de Sertoli e conseqüentemente, várias de suas funções (GRIFFIN, 1988). Estes eventos regulam a espermatogênese de forma

concatenada, de modo que alterações na função das células de Sertoli alteram o crescimento das células germinativas (SHARPE, 1994; SHARPE et al., 2003). Encontradas no epitélio dos túbulos seminíferos, as células de Sertoli apresentam grande dimensão, envolvendo todo o epitélio germinativo (MC ANINCH, 2010). Estruturalmente, elas são conectadas por junções comunicantes, denominadas junções gap, que possibilitam a troca iônica e química entre as células, um fator importante para a coordenação do ciclo do epitélio seminífero; e unidas por junções de oclusão, situadas nas suas paredes basolaterais, formando a denominada barreira hematotesticular (MRUK et al., 2004). Esta divisão que ocorre nos túbulos seminíferos forma a base para a estrutura da barreira de células de Sertoli, possibilitando que a espermatogênese ocorra em um local imunologicamente privilegiado. A formação deste ambiente tem importância significativa, pois, a produção de espermatozoides se inicia na puberdade, enquanto que o amadurecimento do sistema imunológico ocorre nos primeiros anos de vida, portanto os espermatozoides não são reconhecidos como próprios do organismo podendo desencadear uma reação tipo antígeno – anticorpo se forem reconhecidos fora da barreira de células de Sertoli (MENG et al., 2011).

Para STABENFELDT e EDQVIST (1996) a barreira hematotesticular permite a criação de um meio ambiente adluminal, no qual se controla o metabolismo dos espermatozoides. Íons potássio são seletivamente secretados para dentro do espaço adluminal, mantendo os espermatozoides em estado de quiescência. Outra função importante da barreira hematotesticular é a proteção dos espermatozoides de reações inflamatórias, pois durante a sua formação este se torna haplóide e não é reconhecido como próprio do organismo. Acrescente-se que, o acúmulo de espermátocitos secundários, ou seja, haplóides, no interstício, resulta em uma forte reação inflamatória envolvendo principalmente monócitos. Se tal reação ocorrer, pode resultar em obstrução testicular. Além disso, segundo Bergadá (2004) a barreira hemato-testicular protege o desenvolvimento do epitélio germinativo da ação de possíveis toxinas, fatores mutagênicos ou anticorpos específicos.

As células de Sertoli são responsáveis pelo fornecimento de substâncias necessárias para o metabolismo das células germinativas (lactato, transferrina, proteínas andrógeno dependente); fatores de crescimento (fator de célula-tronco, fator transformador de crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β Transforming Growth Factor), fator de crescimento homólogo a insulina (IGF-I – Insulin-like Growth Factor),

fator de crescimento fibroblástico (FGF; Fibroblast Growth Factor), fator de crescimento epidermal (EGF; Epidermal Growth Factor) e hormônios que regulam o desenvolvimento das estruturas reprodutivas masculinas, substância inibidora-mulleriana (MIS) e inibina (SKINNER, 2005).

Por serem as únicas células com receptores para testosterona e para o hormônio folículo-estimulante (FSH), as células de Sertoli são as principais reguladoras da espermatogênese (WALKER et al., 2005). Neste processo as espermatogônias, quiescentes desde o período fetal, iniciam a meiose ainda na região periférica dos túbulos seminíferos, fora do espaço delimitado pela barreira hematotesticular. Os espermatócitos primários formados nessa fase, quando em pré-leptóteno, sinalizam para a abertura da barreira, entrando na região de imunoprivilégio para então completar seu desenvolvimento até a formação dos espermatozoides (MOORE e PERSAUD, 2013). Esse processo é regulado pela interação de sinais endócrinos e parácrinos. O hormônio mais importante nesse processo é o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), produzido pelo hipotálamo. O GnRH induz a produção de LH e FSH, pela hipófise anterior, que agirão no testículo para que esse possa controlar o potencial espermatogênico.

O FSH estimula a atividade das células de Sertoli, incluindo a secreção da proteína ligadora de androgênio (ABP), a conversão de androgênio em estrogênio e a secreção de inibina. A inibina por sua vez faz um feedback negativo sobre a secreção de FSH, porém não sobre a do LH (BLANC et al., 1981). O LH se liga aos receptores presentes na superfície das células de Leydig e estimula a produção de testosterona, um hormônio esteroide que se difunde nos túbulos seminíferos (WALKER et al., 2005). A testosterona produzida é conduzida desde o interstício que circunda as células de Leydig para os vasos linfáticos, túbulos seminíferos e a maior parte para os vasos sanguíneos. Uma proteína plasmática denominada ligadora de hormônio sexual, é importante para o transporte e secreção de testosterona. Na ausência ou redução dessa proteína, a produção de testosterona diminui, sugerindo que concentrações aumentadas de desta no interstício inibam a produção de testosterona (STABENFELDT e EDQVIST, 1996).

Grande parte da testosterona é convertida em diidrotestosterona (DHT), pela enzima 5 α esteróide, enquanto outra porção é convertida em esteróides pela aromatase (DORRINGTON e ARMSTRONG, 1975). Periféricamente, as funções desse hormônio incluem o desenvolvimento e manutenção da libido, da atividade secretora

dos órgãos acessórios via circulação geral e das características de virilidade (HAFEZ, 2004).

2.3 Complexo Principal De Histocompatibilidade

O termo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) refere-se a um grupamento gênico situado no cromossomo 6 em humanos. Este se destaca por apresentar um conjunto de genes polimórficos e em sua maioria responsáveis por codificar proteínas de superfície de membrana que atuam na resposta imune (ABBAS et al., 2012).

Os genes que compõem o MHC estão presentes em todos os vertebrados e foram descritos pela primeira vez no ano de 1940 por George Snell e colaboradores, que através do cruzamento com linhagens de camundongos endogâmicos, identificaram o locus responsável pela expressão de proteínas encarregadas pela rejeição dos enxertos de um camundongo para outro de linhagens diferentes. Em camundongos este locus fica no cromossomo 17 e recebeu o nome de H-2, significando histocompatibilidade-2, por influenciar a histocompatibilidade e também nomear o antígeno correlato inicialmente detectado na membrana de leucócitos dessa espécie (HANSEN et al., 1993; ABBAS et al., 2012).

O MHC humano só foi descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e Van Rood que ao realizarem estudos sorológicos em pacientes transfundidos, perceberam diferenças entre leucócitos de diferentes indivíduos. Por conseguinte, esses genes foram chamados antígenos Leucocitários Humanos ou genes HLA (do inglês Human Leukocyte Antigen). Em humanos, a região do MHC, com aproximadamente 4.000kb de comprimento, localiza-se no braço curto do cromossomo 6 (6p 21.3) (LAMM et al., 1985; BELL, 1989; HYLENIUS, 2004). O sistema gênico HLA apresenta 3 regiões distintas, referidas como HLA de classe I, HLA de classe II e HLA de classe III, sendo que apenas os genes situados nas duas primeiras regiões codificam as proteínas HLA apresentadoras de antígenos para linfócitos T. Os genes situados na região HLA de Classe III codificam outras proteínas não apresentadoras de antígenos mas que atuam na resposta imune ou em outras funções celulares não imunes. (ABBAS, 2012).

Os genes do HLA apresentam uma alta taxa de polimorfismos e um número expressivo de alelos. Atualmente já foram registrados 13.840 alelos. Deste total, 10.297 referem-se aos genes HLA de classe I e 3.543 aos genes HLA de classe II. As moléculas de 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 de superfície celular estável. As moléculas do MHC-II são heterodímeros compostos por uma cadeia polipeptídica alfa (α) e beta (β), estas são expressas nas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), tais como células dendríticas (DC), macrófagos e células B, entretanto, não possuem expressão em células trofoblásticas da placenta (CRESSWELL, 1994).

Na região HLA de Classe I situam-se os genes HLA-A, HLA-B e HLA-C, estes genes apresentam elevado polimorfismo (2.735 alelos nos loci em HLA-A, 3.455 alelos em HLA-B e 2.259 alelos em HLA-C) e possuem expressão constitutiva na membrana celular de quase todas as células nucleadas (TROWSDALE et al., 2001). Os genes, HLA-E, -F e -G constituem os genes de classe I não clássicos nos humanos (WEI E ORR, 1990). Esses genes parecem ter papéis únicos, particularmente em relação aos mecanismos de evasão de patógenos, controle da ativação de NK e reprodução bem sucedida (ISHITANI et al., 2003). A região não clássica do MHC-I apresenta ainda outros genes, como os do grupo MIC (MHC class I chain-related gene), relacionados com a ativação do receptor NKG2D de células NK. As moléculas MIC, diferentemente das outras moléculas de classe I, não se associam a β_2m (COLLINS, 2004; GOLDBERG e RIZZO, 2015).

Os genes HLA classe II codificam as duas cadeias que formam os heterodímeros funcionais HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM e HLA-DO (2.649 alelos conhecidos). Possuem expressão restrita, sendo predominantemente expressas em células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês antigen-presenting cells), como macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans e de Kupffer, assim como linfócitos B. (TROWSDALE et al., 2001)

A região HLA de classe III possui genes que codificam moléculas importantes para a imunidade inata, como os que atuam na ativação do sistema complemento, como o CBF, C2, C4A, C4B, genes que codificam citocinas, como TNF α

(Factor de Necrose Tumoral, do inglês Tumor Necrosis Factor alpha) e LT β (Linfotoxina beta, do inglês Lymphotoxin β), entre outros (LEWIN, 2009).

Atualmente já existem informações sobre a presença de complexos gênicos homólogos ao MHC em outros animais além dos camundongos e seres humanos, como nos bovinos, equinos, suínos, peixes, felinos, caninos, carneiros e outros primatas. A ação do MHC nas demais espécies ocorre de forma similar ao humano, funcionando como um codificador de produtos moleculares envolvidos na resposta imune (CROUAU-ROY et al., 1994; ABBAS et al., 2015).

2.3.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade em bovinos

Em bovinos, o MHC é conhecido como antígeno leucocitário bovino (BoLA), presente no braço curto do cromossomo 23 dessa espécie (FRIES et al., 1988; WU et al., 2010) e consiste de vários locos fortemente ligados entre si, cujos genes codificam moléculas da superfície celular relacionadas à resposta imunológica (ALIZADEH et al., 2003). A estrutura genética do BoLA foi descrita pela primeira vez por Spooner em 1978. Os produtos dos genes do MHC classe I e classe II, presentes nos bovinos, processam peptídeos respectivamente para os linfócitos T citotóxicos (CD8) e T auxiliares (CD4). As moléculas do MHC de ruminantes funcionam de uma maneira semelhante à de humanos e de camundongos (AMILLS et al., 1998).

A estrutura geral do MHC nos mamíferos é relativamente conservada. O complexo BoLA está dividido em três regiões: BoLA-I, essa região é importante no processo de destruição de células infectadas por vírus, BoLA-II, atuam na apresentação de antígenos, na regulação da interação entre células imunocompetentes e no início da resposta imune e BoLA-III participa do sistema complemento, estando envolvidos no imunocomplexos, fagocitose, reação inflamatória e citotoxicidade (SINGH et al., 1997).

O MHC de classe I bovino (BoLA-I) possui alelos clássicos e não clássicos. Existem pelo menos seis genes do MHC-I clássico, que são expressos em combinações de um, dois ou três haplótipos diferentes. Essas glicoproteínas transmembranares desempenham um papel importante na regulação da resposta imune, estando envolvidas na apresentação de antígenos para as células T citotóxicas (CD8+) (ZINKERNAGEL e DOHERTY, 1975). Os bovinos parecem demonstrar níveis únicos de variação na

composição de haplótipos de MHC de classe I. Essas moléculas apresentam ampla semelhança com o MHC humano em termos de localização genômica, estrutura genética e perfil de expressão (BIRCH et al., 2008).

Os loci não clássicos possuem alelos de 1 a 4, BoLA- NC1, NC2, NC3 e NC4 (DAVIES et al., 2006; BIRCH et al., 2008). O locus BoLA-NC1 é oligomórfico ou polimórfico e possui cinco alelos, além de ausência do domínio transmembrana, devido a completa deleção do exon 5. Os locis NC2 e NC3 são monomórficos e expressos em altas concentrações no trofoblasto, já o locus NC4, igualmente ao locus NC1, é oligomórfico, mas é expresso em baixos níveis no trofoblasto, o que o diferencia dos loci NC2 e NC3 (BIRCH et al., 2008; SANTOS et al., 2015).

As proteínas não clássicas do MHC-I 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).

Pouco se sabe a respeito do MHC-I não clássico bovino, mas estudos em humanos e camundongos demonstraram que as isoformas não clássicas desse gene interagem com receptores inibitórios de citocinas ou de células NK para inibir a resposta imune materna. As isoformas solúveis humanas (ex. HLA-G) são fatores imunossupressivos e induzem a apoptose de células TCD8+ ativada. Aparentemente a proporção de expressão entre os genes clássicos e não clássicos em trofoblastos bovinos deve influenciar o balanço entre imunossupressão e sistema imune ativado (DAVIES et al., 2006).

Genes relacionados à cadeia do MHC –Ib (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). No entanto, enquanto essas espécies possuem um ou dois genes MIC funcionais, é possível que nos bovinos existam três ou quatro genes funcionais. A similaridade de tamanhos de intron e sequência dentro das regiões codificadoras de bovinos MIC1, MIC2, MIC3, MIC4 e sua proximidade, sugerem que estes podem ter surgido por duplicação de um gene

ancestral (BIRCH et al., 2008). Esses genes 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).

O MHC de classe II bovino (BoLA-II) é expresso em células especializadas do sistema imunológico, como os linfócitos e foi subdividido em BoLA-IIa e IIb – com base no mapeamento genético (AMORENA e STONE, 1980; LEVEZIEL e HINES, 1984; VAN EIJK et al., 1992; DAVIES et al., 1997; MOTA, 2003). As sub-regiões BoLA-IIa e BoLA-IIb estão a cerca de 15 centímetros de distância. A sub-região BoLA-IIa contém o conjunto de genes DR e DQ (SCOTT et al., 1987). O gene BoLA-DRB3 tem sido amplamente estudado por seu grande polimorfismo (TAKESHIMA e AIDA, 2006; WU et al., 2010), em especial no éxon 2 (BoLA-DRB3.2) por possuir associação com a contagem de células somáticas (CCS) (SHARIF et al., 1998a) e alguns aspectos produtivos (NASCIMENTO et al., 2006). Já a sub-região BoLA-IIb inclui os genes DMA, DMB, LMP2, LMP7 e TAP moléculas que estão envolvidas no processamento, transporte e carregamento de peptídeos antigênicos. (LEWIN, 1996; DAVIES et al., 1997).

A região BoLA-III é constituída por um conjunto heterogêneo de genes relacionados com a imunologia, tais como fatores do complemento C4 e BF, esteroide 21-hidroxilase (CYP21), proteína de choque térmico 70 (HSP70) e o fator de necrose tumoral (TNF α e TNF β) que não são considerados parte do MHC (ANTCZAK et al., 1982; LEWIN, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a expressão gênica de MHC de Classe I não clássico durante a espermatogênese bovina.

3.2 Específicos

- Determinar através de escores histológicos, a partir do critério de pontuação de Johnsen, a qualidade da espermatogênese em tecido testicular bovino.
- Determinar o perfil de expressão de MHC-I não clássico em testículos bovinos.
- Comparar o perfil histológico dos testículos bovinos com a expressão do gene MHC-I não clássico, como critérios de avaliação da espermatogênese.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Estudo

A coleta das amostras testiculares realizou-se em abatedouros do município de São Luís, Maranhão, de forma casuística, de acordo com o número de animais disponíveis. O material biológico coletado foi transportado em caixas isotérmicas com gelo e posteriormente acondicionado em freezer a - 20°C no Laboratório de Patologia Molecular, da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) no curso de Medicina Veterinária, Campus São Luís - MA, onde também foram realizados os testes moleculares.

4.2 Colheita das Amostras

Foram coletadas amostras bilaterais (testículo esquerdo e direito) de 36 bovinos inteiros sem padrão racial. Imediatamente após o abate, realizava-se a antissepsia cuidadosa dos testículos utilizando álcool 70%, seguida da abertura e retirada de fragmentos do parênquima testicular. Prontamente, estas amostras eram imersas em formalina tamponada a 10% e em seguida encaminhadas para o Laboratório de Anatomopatologia da Universidade Estadual do Maranhão/CCA/UEMA. Fragmentos utilizados para os testes moleculares também foram retirados e devidamente acondicionados em criotubos estéreis, *RNAse Free* contendo a solução de estabilização RNAlater® (Life Technologies), mantidos sob refrigeração por no mínimo 24 horas e posteriormente acondicionados a -20°C até a realização dos testes moleculares.

4.3 Processamento Histológico

Após a fixação dos tecidos em formalina tamponada 10% durante 24 horas, os tecidos foram processados para a preparação de lâminas histológicas, sendo colocados em cassetes plásticos, seguido da etapa de desidratação, no qual o material foi mergulhado em concentrações crescentes de álcool (álcool 70%, 80%, 95%, absoluto I e II, correspondentes a 99% de pureza). Em seguida, houve o processo de diafanização ou clarificação através de banhos em xilol e posteriormente realizou-se inclusão do tecido em parafina.

O material foi cortado na espessura de cinco micrômetros (5 μm) com micrótomo de rotação HM 360 MICROM e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). Antes da coloração, as lâminas foram banhadas em xilol, por 10 minutos para dissolução da parafina, em seguida, imersas em concentrações crescentes de álcool, até o tecido estar completamente hidratado. Então as lâminas foram mergulhadas em água destilada por três minutos, em seguida, mergulhadas em hematoxilina, por aproximadamente um minuto, lavadas por 15 minutos em água destilada, mergulhadas em eosina por 45 segundos e para a lavagem foram mergulhadas e retiradas rapidamente em água corrente. Depois de corado, o tecido foi passado em concentrações decrescentes de álcool (desidratação), para aumentar a sobrevivência do preparo histológico. Finalmente as lâminas foram banhadas em xilol, e em seguida, iniciou-se a montagem das lâminas, processo no qual foi colocado sobre uma lamínula uma gota de resina sintética e esta foi colocada e comprimida sobre o corte, de modo a espalhar-se uma fina camada desta entre a lâmina e lamínula.

4.4 Classificação da Espermatogênese

A avaliação da espermatogênese foi realizada através do sistema de pontuação de Johnsen (1970), que consiste em uma avaliação histológica de pelo menos 25 túbulos seminíferos (TUREK, 2005), no qual se observa o nível de maturação do epitélio germinativo e os classifica entre 1 e 10 (Tabela 1), de acordo com o tipo de célula germinativa mais avançada do túbulo. Neste trabalho optou-se pela análise de 40 túbulos seminíferos e o cálculo do escore médio foi realizado pela multiplicação do número de túbulos contados pelo seu escore de um a dez. Todos estes valores foram somados e divididos pelo número total de túbulos contados (Quadro 1).

Tabela 1 – Critérios de avaliação espermática segundo a pontuação de Johnsen.

PONTUAÇÃO DE JOHNSEN	CÉLULAS ENCONTRADAS
Escore 10	Espermatogênese completa com muitas espermátides alongadas. Epitélio germinativo organizado com espessura preservada e a luz do túbulo livre.
Escore 9	Muitas espermátides alongadas estão presentes, mas, o epitélio germinativo está desorganizado com evidente descamação ou obliteração da luz do túbulo.
Escore 8	Apenas algumas espermátides alongadas (menos de cinco) presentes no corte transversal do túbulo seminífero.
Escore 7	Ausência de espermátides alongadas e presença de muitas espermátides em alongamento e arredondadas.
Escore 6	Ausência de espermátides alongadas e presença de poucas espermátides em alongamento e arredondadas (menos de cinco).
Escore 5	Ausência de espermátides e presença de muitos espermatócitos.
Escore 4	Presença de poucos espermatócitos (menos de cinco) e ausência de espermátides.
Escore 3	Espermatogônias são as únicas células germinativas presente.
Escore 2	Ausência de células germinativas e presença de apenas células de Sertoli.
Escore 1	Ausência de células no corte transversal do túbulo seminífero.

Adaptado de Augusto Barbosa Reis, 2012.

Quadro 1 – Cálculo para obtenção do Critério de Johnsen.

Escores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
N° de túbulos por escore	0	0	0	0	0	0	10	4	12	14	40
N° de túbulos x escore	0	0	0	0	0	0	70	32	108	140	350
N° de túbulos X escore / N° de túbulos por escore = Escore Final											350/40= 8,8

Adaptado de Augusto Barbosa Reis, 2012.

4.5 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 200µL de clorofórmio, homogeneizado vigorosamente e incubado em temperatura ambiente por três minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C, para separação em três fases. A fase superior foi transferida para outro microtubo e adicionou-se 500µL de isopropanol, para precipitação do RNA, seguida de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70%, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 7.500 xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o RNA foi dissolvido em 30µL de água livre de RNase. Todo o protocolo descrito foi preconizado pela Invitrogen; Carlsbad, CA, USA. Posteriormente, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria.

4.6 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) seguindo o protocolo do fabricante. Para uma reação de volume final de 20µL.

Para a síntese foram utilizados 3,0µL de água DEPC, 1,0µL de Random Hexâmero (50µg/µL), 1,0µL de Anneling Buffer, 2,0µL de RNase OUTTM Enzime Mix, 10,0µL 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 minuto, 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos. Posteriormente o cDNA foi armazenado a -20°C.

4.7 PCR Quantitativa (qPCR)

Para a realização da PCR em tempo real foram utilizados primers específicos para MHC-I não clássico, NC1, NC3 e MICB (SHU et al., 2012), além do gene normalizador GAPDH, descritos na tabela 2. A PCR quantitativa foi realizada utilizando-se 2,5 µl de cDNA, 10 µM do par de primers específico para cada gene e 12,5 µl de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix – UDG with ROX, Invitrogen) em um volume final de 25 µl por reação. Os parâmetros utilizados para o PCR em tempo real serão: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando um termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems).

Tabela 2 – Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto	Sequência de referência no NCBI	Referência
MICB	AGAAAGGAGGCTTACATTCCC GCCTGGTAATGCTTGCTTAAC	199	NM_001127317	Shu et al., 2012
NC1	AGTATTGGGATCAAGAGACGC ATAGGCGTGCTGATTATACCC	181	BC109706	Shu et al., 2012
NC3	AGATGACACGAGATGCCAAG TCGTTTCAGGGCGATGTAA	198	DQ140378	Shu et al., 2012
GAPDH	GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG	195	NM_001034034. 2	Davies et al., 2006

GCTGACAATCTTGAGGGTGTTG

4.8 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 diferentes genes no mesmo escore de Johnsen foram comparadas pelo teste t de Student (Graphpad Prism 5.0, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

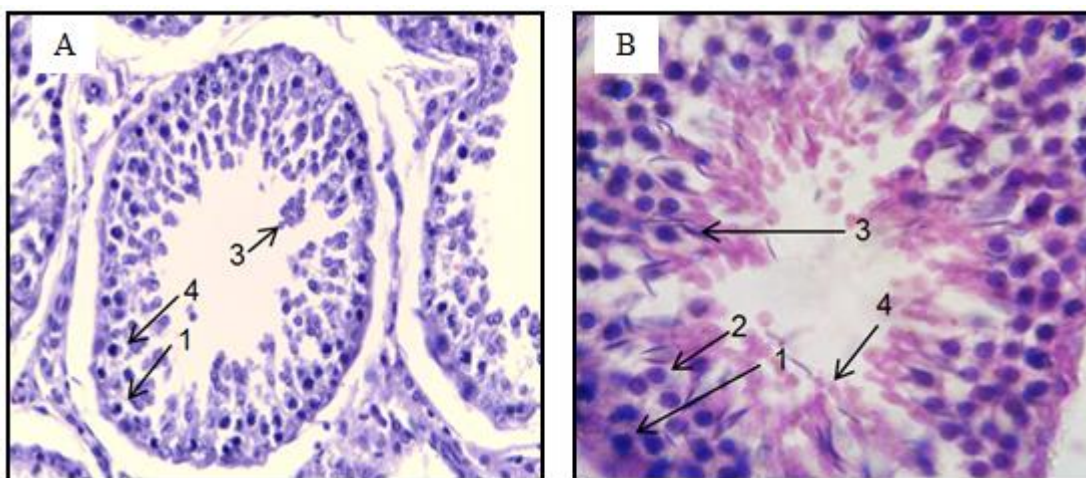
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise Histológica

Foram analisadas 72 amostras provenientes de 36 animais (testículo direito e esquerdo), correspondendo à região de parênquima testicular. Os valores médios da espermatogênese, foram obtidos por meio do escore descrito por Johnsen (1970) no qual, minuciosamente, realizou-se a avaliação histológica e observação dos túbulos seminíferos.

Nas análises das lâminas histológicas, observou-se que os animais utilizados no estudo obtiveram notas entre 6 e 8 no Escore de Johnsen (1970). Resultados equivalentes ao presente experimento foram encontrados por Reis (2012) em estudo realizado com homens, no qual os escores médios das amostras foram semelhantes e incluídas no mesmo grupo classificatório. Ao exame microscópico também foi possível verificar as diferentes fases de espermatogênese em único fragmento o que segundo Turek, (2005) classifica o material estudado como um padrão misto contendo as fases: 1- fase espermatogonial com presença de espermatogônias e espermatócitos primários; 2- fase espermatocitogênica, apresenta espermatócitos secundários e espermatídes; 3- fase espermiogênica, com presença de espermatídes e espermatozoides (Figura 1).

Figura 1 – Corte histológico do parênquima testicular bovino, coloração Hematoxilina e Eosina (40x). A. Túbulo seminífero apresentando espermatogênese incompleta, com ausência de espermátides em alongamento e alongadas. B. Túbulos seminíferos apresentando células espermatogoniais (1), espermatócitos (2) e espermatídes arredondadas e em alongamento (3) e espermátides alongadas (4).



A avaliação do potencial de fertilidade do macho é baseada na funcionalidade do trato reprodutivo que tem reflexo importante no número de espermatozoides normais que alcançam o local de fecundação e conseqüentemente, influenciando na penetração do oócito, fertilização e desenvolvimento embrionário (LAGERLOF, 1934; BARTH e OKO, 1989). A presença de diferentes escores por túbulos, na composição da média dos resultados, também foi um fator determinante para que as amostras do presente estudo apresentassem escores médios semelhantes. Por conseguinte, esse resultado pode ser justificado pela homogeneidade das amostras coletadas, no qual se utilizou animais jovens provenientes de abatedouros e submetidos ao mesmo manejo sanitário e reprodutivo.

Fatores como o estresse, a superpopulação ou isolamento, exposição a um ambiente desconhecido, transporte, confinamento, contenção ou imobilização, calor ou frio intenso, intervenções cirúrgicas e a dor podem desencadear alterações orgânicas e originar diversos problemas, dentre eles, os reprodutivos. (MOBERG e MENCH, 2000). O que não foi observado na amostragem deste trabalho, pois não foram observadas patologias macroscópicas ou mesmo microscópicas nos testículos avaliados, sendo portanto os escores determinados apenas pela qualidade espermática e potencial reprodutivo dos bovinos (N casuístico) provenientes de abatedouros.

Nas amostras pertencentes ao escore 7 observou-se a parada da espermatogênese com a presença de espermátides em alongamento nos túbulos seminíferos. Supõe-se que a parada nesta fase da espermatogênese não reflete necessariamente um distúrbio na produção espermática, e sim fase do ciclo em que o animal foi abatido. A literatura descreve que o avanço no desenvolvimento da produção espermática, determina a observação histológica de células em diferentes fases de maturação no túbulo seminífero (JOHNSON et al., 2000).

Contudo, devem-se considerar também estudos realizados por Johnson e colaboradores (2000) que demonstram degenerações das células germinativas como as alterações de maior impacto durante a meiose e a espermiogênese, fases estas que são caracterizadas, respectivamente, pela população de espermatócitos e na qual as espermátides sofrem significativas modificações, transformando-se em espermatozoides (CASTRO, 2012). Na amostragem deste trabalho não foi possível determinar este impacto, pois não foram observadas degenerações claras nas camadas germinativas, apenas variadas fases de maturação.

A análise realizada através do critério estabelecido por Johnsen (1970) permite a avaliação mais detalhada do túbulo seminífero, com identificação mais adequada dos componentes celulares do epitélio, permitindo melhor classificação morfológica e identificação precisa das paradas de maturação que ocorrem nas células germinativas.

5.2 Expressão do gene MHC-I não clássico no testículo

Ao exame microscópico observou-se que os animais utilizados no estudo obtiveram pontuações entre 6 e 8 no Escore de Johnsen (1970). Das 72 amostras analisadas foram utilizadas para avaliação molecular 12 amostras por escore totalizando 36 amostras divididas nos escores obtidos 6, 7 e 8 (Tabela 3).

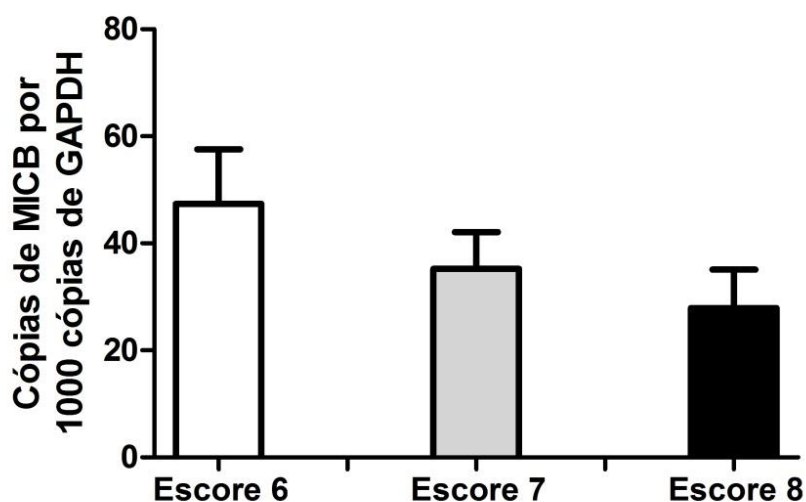
Tabela 3 – Quantidade de amostras por escore submetidas RT-PCR.

PONTUAÇÃO JOHNSEN	AMOSTRAS SUBMETIDAS A RT-PCR
Escore 6	12 amostras
Escore 7	12 amostras
Escore 8	12 amostras

Para avaliação do MHC-I não clássico foram utilizados os genes descritos para bovinos MICB, NC1 e NC3, genes inibitórios para receptores de leucócitos, incluindo receptores codificados no complexo do grupo de células “*Natural Killer*” naturais 2D (NKG2D) e no complexo de receptores de leucócitos (SHU et al., 2012). Os dados da análise do qPCR demonstraram que não houve diferença estatística significativa na expressão de MHC-I não clássico no tecido testicular de bovinos. Contudo, na avaliação da expressão do MICB observou-se tendência de maior expressão nas amostras com escore 6, seguida da diminuição da expressão nos escores 7 e 8 (Figura 2). Em estudos realizados por Santos et. al., (2015) utilizando fêmeas bovinas em idade reprodutiva e em diferentes períodos gestacionais, observou-se que os genes MICB e NC3 foram expressos em níveis elevados nas células trofoblásticas da

região intercotiledonária de fêmeas bovinas durante os dois primeiros terços gestacionais seguindo com diminuição no último terço de gestação, considerando a participação da molécula de MHC no período gestacional da fêmea bovina, surgiu a hipótese da importância da mesma molécula no testículo bovino, já que esta já havia sido descrita em outras espécies, especialmente no homem, através do HLA (CHIANG et al., 1994; LANGAT et al., 2006; LARSEN et al., 2011), contudo a molécula do MHC-I não clássica parece não ter o mesmo envolvimento na espermatogênese bovina devido a sua discreta expressão demonstrada nos resultados deste trabalho.

Figura 2 – Expressão de MHC de classe I não clássico utilizando gene MICB nos diferentes escores de Johnsen. Colunas representam média aritmética (n = 12) e erro padrão.



Na expressão do gene NC1 foi possível observar uma maior expressão nas amostras com escore 6, seguida da diminuição da expressão no escore 7 e posterior elevação no escore 8 (Figura 3). Já na avaliação da expressão do gene NC3 (Figura 4) nos três escores apresentados, observou-se maior expressão em animais com Escore 8, ou seja, aqueles que estão classificados como animais com nível de espermatogênese normal. Contudo no homem, segundo Yao et al. (2014) esta expressão foi elevada e determinou diferenças significativas em seus resultados, o que não se repetiu nesta amostragem bovina, em que se observa apenas uma tendência e a avaliação gráfica é

apenas numérica, o que mais uma vez sugere que esta molécula não apresenta marcada atuação sobre a espermatogênese.

Figura 3 – Expressão de MHC de classe I não clássico utilizando gene NC1 nos diferentes escores de Johnsen. Colunas representam média aritmética (n = 12) e erro padrão.

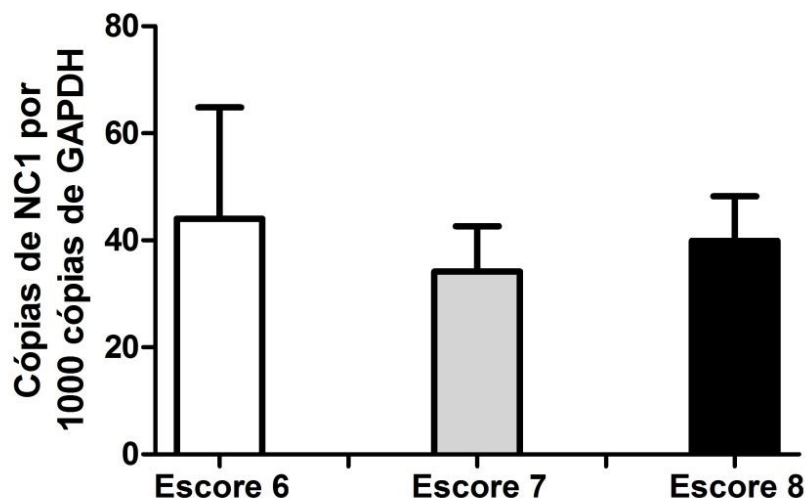
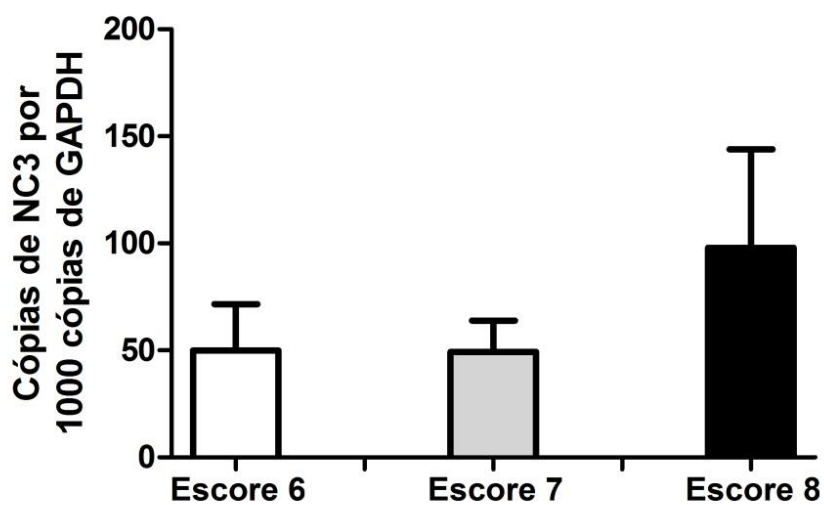


Figura 4 – Expressão de MHC de classe I não clássico utilizando gene NC3 nos diferentes escores de Johnsen. Colunas representam média aritmética (n = 12) e erro padrão.



As primeiras pesquisas realizadas nessa área de estudo negavam a presença de moléculas MHC de classe I na superfície de células germinativas testiculares (ANDERSON et al., 1984; KOWALIC et al., 1989). No entanto, novos estudos indicaram a possibilidade de indução do MHC em células gametogênicas de homens com azoospermia, possivelmente devido a fatores que ativam a resposta imune, como vírus ou citocinas (KURPISZ et al., 1987). A expressão do gene HLA-G foi detectado pela primeira vez em espermatozoides maduros de humanos em 1994 por Chiang e colaboradores através da técnica de RT-PCR, verificou-se ainda a tendência de aumento da expressão do gene HLA-G acompanhado do aumento no valor de pontuação Johnsén. Langat et al. (2006) observou a presença do gene HLA-G em glândulas prostáticas e adenocarcinomas da próstata normal utilizando a PCR em tempo real, além de conseguir detectar a proteína no citoplasma do epitélio túbulo-glandular e em secreções glandulares através da imuno-histoquímica.

Posteriormente, utilizando a técnica ELISA, foi possível constatar a expressão do HLA-G em amostras de plasma seminal humano, além da expressão dessa molécula em amostras de tecidos testiculares normais e em tecidos epididimal por coloração imuno-histoquímica (LARSEN et al., 2011). Em pesquisa realizada com o macaco-Rhesus observou-se a expressão em níveis elevados da molécula de MHC na placenta e no testículo, confirmando a homologia entre o HLA-G e o Mamu-AG, a molécula não clássica do macaco-Rhesus (RYAN et al., 2002).

Nos testículos, o MHC-Ib pode ter um papel funcional que serve como um fator imunossupressor, evitando assim o reconhecimento de células do esperma que são consideradas como auto antígenos para o sistema imunológico. Análises indicam que os fatores específicos no plasma seminal podem interagir com as células e vias funcionais no trato reprodutor feminino. Isso pode levar a uma variedade de alterações celulares e moleculares que se assemelham a uma resposta inflamatória. Sendo assim, uma das funções do MHC-Ib pode ser a manutenção dos testículos como um sítio imune privilegiado. Outra função seria realizar uma interação do HLA-G com o receptor de leucócitos do tipo imunoglobulina ou transcrição do tipo imunoglobulina, que conduz a uma inibição da proliferação de células CD4⁺ e a função citotóxica das células “*Natural Killer*” no sistema reprodutor feminino. Nas fêmeas, a exposição repetida desta ao sêmen e aos fatores paternos presentes nele torna possível à produção de uma imunomodulação, essa resposta pode ser importante para a manutenção e sucesso da

gestação, já que o trato genital feminino é considerado um local imunocompetente (ROBERTSON, 2003; ROBERTSON, 2005; LARSEN et al., 2011).

Nesta pesquisa, a mínima expressão do MHC no testículo bovino dá o direcionamento ao estudo de outras moléculas que podem estar envolvidas no controle e maturação celular ao longo da espermatogênese. Desta forma, se faz necessário a realização de pesquisas adicionais utilizando proteínas e citocinas relacionadas com a diferenciação das células espermáticas para o profundo conhecimento no papel desempenhado por essas na imunidade do animal.

6. CONCLUSÃO

- A avaliação histológica e molecular permitiu a observação da reduzida expressão do gene MHC-I não clássico em tecidos testiculares com capacidades espermatogênicas normais, o que desqualifica os genes de MHC-I como marcadores de qualidade espermatogênica.
- A espermatogênese bovina avaliada neste trabalho variou dos escores seis a oito e permitiu a confirmação dos critérios de Johnsen como uma ferramenta fundamental para qualificação da espermatogênese em bovinos;
- O Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I não clássico é pouco expresso no tecido testicular de bovinos;
- Não houve diferença de expressão dos genes de MHC de classe I não clássico nos diferentes escores avaliados;

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados acima descritos faz-se necessário a realização de mais estudos utilizando animais com níveis espermatogênicos inferiores e superiores, com intuito de definir completamente a participação do MHC-Ib no testículo bovino. Além disso, outras moléculas relacionadas a interações hormonais ou receptores estruturais, podem estar envolvidas no mecanismo da espermatogênese, necessitando de estudos moleculares mais profundos para que sejam propostos reais marcadores de qualidade espermatogênica que auxiliem nesta avaliação reprodutiva.

REFERÊNCIAS

- ABBAS A.K.; LICHTMAN A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro. Elsevier , 2008. 564p.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2012.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2015.
- ABIEC Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em: < http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp > Acesso em: 20 ago. 2016.
- AGUIAR, G. V., ARAÚJO, A. A., MOURA, A. de A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1629-1638, 2006.
- ALIZADEH, Z.; KARROW, N.; MALLARD, B.A. Biological effect of varying peptide binding affinity to the BoLA-DRB3*2103 allele. **Genetics Selection Evolution**, v.35, Suppl. 1, p.S51-S65, 2003.
- AMILLS, M.; RAMIYA, V.; NONMINE, J.; LEWIN, H.A. The major histocompatibility complex of ruminants. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, n. 1, p. 108-120, 1998.
- AMORENA, B.; STONE, W.H. Bovine lymphocyte antigens (BoLA): a serologic, genetic and histocompatibility analysis. **Tissue Antigens**, v. 16, n. 3, p. 212-225, 1980.
- ANDERSON, D. J.; NARAYAN, P.; DEWOLF, W. C. Major histocompatibility antigens are not detectable on post-meiotic human testicular germ cells. **The Journal of Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1962-1965, 1984.
- ANTCZAK, D. F. Structure and function of the major histocompatibility complex in domestic animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 10, p. 1030-1036, 1982.
- BAHRAM, S.; BRESNAHAN, M.; GERAGHTY, D. E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 14, p. 6259-6263, 1994.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa: University Press, 1989, 285 p.
- BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. **Trends in Genetics**., v.5, n. 9, p. 289-290, 1989.
- BERGADÁ, C. Função endócrina do testículo. In: CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia humana de Houssay**. 7ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 695-704.

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

BLANC, M. R.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; CAHOREAU, C.; COUROT, M.; DECHEUX, J. C. Inhibin: effects on gonadotropin secretion and testis function in ram and rat. In: FRANCHIMONT, P. AND CHANNING, C.P. (Eds.). **Intragonadal Regulation Of Reproduction**. New York: Academic press, 1981.

BOOCKFOR, F.R.; BARNES, M.A.; DICKEY, J.F. Effects of unilateral castration and unilateral cryptorchidism of the Holstein bull on in vitro Leydig cell response. **Journal of Animal Science**, v.56, p.1386-1392, 1983.

CASTRO, M. M. D. **Duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática de *Leopardus pardalis*, Linnaeus 1758**. 2012. 64f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

CHIANG, M.H.; STEUERWALD, N.; LAMBERT, H.; MAIN, E.K.; STEINLEITNER, A. Detection of human leukocyte antigen class I messenger ribonucleic acid transcripts in human spermatozoa via reverse transcription-polymerase chain reaction. **Fertil Steril**, v. 61, p. 276–280, 1994.

COLLINS, R. W. M. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. **European journal of immunogenetics**, v. 31, n. 3, p. 105-114, 2004.

CRESSWELL, P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. **Annual review of immunology**, v. 12, n. 1, p. 259-291, 1994.

CROUAU-ROY, B.; AMADOU, C.; BOUISSOU, C.; CLAYTON, J.; VERNET, C.; RIBOUCHON, M. T.; PONTAROTTI, P. Localization of the OTF3 gene within the human MHC class I region by physical and meiotic mapping. **Genomics**, v. 21, n. 1, p. 241-243, 1994.

DAUSSET, J. **Leuco agglutinins and blood transfusion**. Vox sanguinis, Oxford, v. 4, p. 190-194, 1954.

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. **Animal Genetics**, v. 28, n. 3, p. 159-168, 1997.

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, n. 2, 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. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 55, n. 3, p. 188–200, 2006.

DORRINGTON, J.H.; ARMSTRONG, D.T. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol 17- synthesis in cultured Sertoli cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 7, p. 2677-2681, 1975.

FIJAK, M.; MEINHARDT, A. The testis in immune privilege. **Immunological Reviews**, v. 213, n. 1, p. 66-81, 2006.

FORMIGONI, I. B. **Estimação de valores econômicos para características componentes de índices de seleção em bovinos de corte**. 2002. 179f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

FRIES, R.; BECKMANN, J.S.; GEORGES, M. et al. The bovine gene map. **Animal Genetics**, v. 20, p. 3-29, 1988.

GOLDBERG, A. C.; RIZZO, L. V. Estrutura do MHC e função– apresentação de antígenos. Parte 2. **Einstein (16794508)**, v. 13, n. 1, 2015.

GRIFFIN, J. E. Male reproductive function. In: GRIFFIN, J. E.; OJEDA, S. R. (Eds.), **Textbook of endocrine physiology**. New York: Oxford University Press, 1988. p. 165-185.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução masculina. In. HAFEZ, ESE; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed. Barueri: Manole, p. 3-12, 2004.

HANSEN T. H.; CARRENO, B. M.; SACHS, D. H. The Major Histocompatibility Complex. In: WE, P. (Ed). **Fundamental Immunology**. ed. 3, p. 577-628, 1993.

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 stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 3, p. 1395-1400, 2002.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; MCINTIRE, R. H.; OBER, C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 7, p. 681-693, 2005.

HUNT, J. S.; LANGAT, D. K.; MCINTIRE, R. H.; MORALES, P. J. The role of HLA-G in human pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 1, 2006.

HYLENIUS, S; ANDERSEN, A-M. N; MELBY, M; HVIID, T. V. Association between HLA-G genotype and risk of preeclampsia: a case-control study using family triads. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 237-246, 2004,

IBGE Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br>> Acesso em: 02 out. 2016.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D. E. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1376-1384, 2003.

JOHNSEN, G.J. Testicular Biopsy Score Count – A method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 1, n. 1, p. 2-25, 1970.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E.; SMITH T. L.; KEILLOR G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: A comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 180-471, 2000.

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. **Animal Genetics**, v. 22, p. 455-463, 1991.

KOWALIK, I.; KOWALIK, I.; KURPISZ, M.; JAKUBOWIAK, A.; JANECKI, A.; ŁUKASZYK, A.; SZYMCZYNSKI, G. Evaluation of HLA Expression on Gametogenic Cells Isolated from Human Testis/Auswertung der HLA-Expression von Keimzellen aus dem menschlichen Hoden. **Andrologia**, v. 21, n. 3, p. 237-243, 1989.

KURPISZ, M.; FERNANDEZ, N.; WITT, M., KOWALIK, I.; SZYMCZYNSKI, G. A.; FESTENSTEIN, H. HLA expression on human germinal cells. **International Journal of Immunogenetics**, v. 14, n. 1, p. 23-32, 1987.

LAGERLOF, N. Morphological studies on the changes sperm structure and in the testis of bulls with decreased or abolished fertility. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, n. 19, p. 254-266, 1934.

LAMM, L. U; OLASEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 5 and 6. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 40, p. 128, 1985.

LANGAT, D.K.; SUE PLATT, J.; TAWFIK, O.; FAZLEABAS, A.T.; HUNT, J.S. Differential expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G) messenger RNAs and proteins in normal human prostate and prostatic adenocarcinoma. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, n. 1, p. 75-86, 2006.

LARSEN, M.H.; BZOREK, M.; PASS, M.B.; LARSEN, L.G.; NIELSEN, M.W. et al. Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma. **Molecular Human Reproduction**, v. 17, n.12, p. 727–738, 2011.

LE DISCORDE, M.; MOREAU, P.; SABATIER, P.; LEGEAIS, J.M.; CAROSELLA, E.D.; Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1039-1044, 2003.

LEVEZIEL, H.; HINES, H.C. Linkage in cattle between the major histocompatibility complex (BoLA) and the M blood group system. **Génétic, Sélection, Evolution**, v. 16, n. 4, p. 405-416, 1984.

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

LEWIN, B. Diversidade Imune. In: **Genes IX**. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, p.570- 608, 2009.

LOW, B. G.; HANSEN, P. S.; DROST, M.; GOGOLIN-EWENS, K. J. Expression of major complex antigens on the bovine placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 235-243, 1990.

MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Dados de bovinos e bubalinos no Brasil – 2015**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> > Acesso em: 02 out. 2016

MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e Bubalinos**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos> > Acesso em: 02 out. 2016

MARTIN-DU PAN, R. C.; CAMPANA, A. Physiopathology of spermatogenic arrest. **Fertility and Sterility**, v.60, n.6, p.937-946, 1993.

MCANINCH, J.W.; TANAGHA, E.A. **Urologia geral de Smith**. 17^aed. Rio de Janeiro: Artmed; 2010.

MENG, J.; GREENLEE, A. R.; TAUB, C. J.; BRAUN, R. E.; Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 2, p. 254-260, 2011.

MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. Cambridge: CABI Publishing, 2000. 377p.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **The Developing Human: Clinically Oriented Embryology**. 10. ed. Philadelphia. Elsevier, 2013.

MOTA, A. F. **Descobrimos genes expressos na glândula mamária e relacionados à ocorrência e controle da mastite bovina**. 2003. 170f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2003.

MOURA, M. I. **Características espermáticas de reprodutores nelore com dermatite digital**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)–Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

NASCIMENTO, C. S.; MACHADO, M. A.; MARTINEZ, M. L.; SILVA, V. G. B.; GUIMARÃES, M. F. M.; CAMPOS, A. L.; AZEVEDO, A. L. S.; TEODORO, R. L.; VERNEQUE, R. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; OLIVEIRA, D. A. A. Association of the bovine major histocompatibility complex (BoLA) BoLA-DRB3 gene with fat and protein production and somatic cell score in Brazilian Gyr dairy cattle (*Bos indicus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 641-647, 2006.

PAYNE R. Leukocyte agglutinins in human sera; correlation between blood transfusions and their development. **AMA Archives of Internal Medicine**, v. 99, n. 4, p.587-606, 1957.

REIS, A. B. Estudo comparativo entre diferentes processamentos histológicos na interpretação de biopsias testiculares. 2012. 93f. Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à cirurgia e à oftamologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

ROBERTSON, S. A.; BROMFIELD, J. J.; TREMELLEN, K. P. Seminal ‘priming’ for protection from pre-eclampsia—a unifying hypothesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 2, p. 253-265, 2003.

ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 1, p. 43-52, 2005.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, Florida.: Cache River Press, 1990. 286p.

RYAN, A. F.; GRENDALL, R. L.; GERAGHTY, D. E.; GOLOS, T. G. A soluble isoform of the rhesus monkey nonclassical MHC class I molecule Mamu-AG is expressed in the placenta and the testis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 673–683, 2002.

SANTOS, L. S.; DA SILVA MOL, J. P.; DE MACEDO, A. A.; SILVA, A. P. C.; DOS SANTOS RIBEIRO, D. L.; SANTOS, R. L.; DE CARVALHO NETA, A. V. Transcription of non-classic Major Histocompatibility Complex (MHC) class I in the bovine placenta throughout gestation and after *Brucella abortus* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 167, n. 3, p. 166-170, 2015.

SCHANBACHER, B. D. Hormonal regulation of the male pituitary. In: **10. international congress on animal reproduction and artificial insemination, University of Illinois at Urbana-Champaign (USA), 10-14 Jun 1984**. University of Illinois at Urbana-Champaign, 1984.

SCOTT, P. C.; CHOI, C. L.; BRANDON, M. R. Genetic organization of the ovine MHC class II region. **Immunogenetics**, v. 25, n. 2, p. 116-122, 1987.

SHARIF, S.; MALLARD, B.A.; WILKIE, B.N. et al. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLADRB3) occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 185-193, 1998a.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. v.1, p.1364-1434.

SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769-784, 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. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 5, p. 569-75, 2012.

SINGH, N.; AGRAWAL, S.; RASTOGI, A.K. Infectious diseases and immunity: special reference to major histocompatibility complex. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 41-49, 1997.

SKINNER, MICHAEL K. Sertoli cell secreted regulatory factors. **Sertoli Cell Biology**, p. 107-120, 2005.

SPOONER, R. L.; LEVEZIEL, H.; GROSCLAUDE, F.; OLIVER, R. A.; VAIMAN, M. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. **International Journal of Immunogenetics**, v. 5, n. 5, p. 335-346, 1978.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.603-614.

TAKESHIMA, S.N.; AIDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 2, p. 138-150, 2006.

TIZARD, I. R. Resistência aos tumores. In: TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 343-356.

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

TUREK, P.J. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 2, n. 5, p. 226-238, 2005.

VAN EIJK, M. J. T.; STEWART-HAYNES, J. A.; LEWIN, H. A. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. **Animal Genetics**, v. 23, n. 6, p. 483-496, 1992.

VAN ROOD, J. J.; VAN LEEUWEN, A.; EERNISSE, J. G. Leucocyte antibodies in sera of pregnant women. **Vox sanguinis**, v. 4, n. 6, p. 427-444, 1959.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction**, v. 130, n. 1, p. 15-28, 2005.

WEI, XIAOHUA; ORR, H. T. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. **Human immunology**, v. 29, n. 2, p. 131-142, 1990.

WU, X.X.; YANG, Z. P.; WANG, X. L.; MAO, Y. J.; LI, S. C.; SHI, X. K.; CHEN, Y. 2010. Restriction fragment length polymorphism in the exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Chinese Holstein of the south China. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 3, n. 2, p. 221-225, 2010.

YAO, G.D.; SHU, Y.M.; SHI, S.L.; PENG, Z.F.; SONG, W.Y.; JIN, H.X.; SUN, Y.P. Expression and potential roles of HLA-G in human spermatogenesis and early embryonic development. **PLoS One**, v. 9, n. 3, e92889, 2014.

ZIDI, I.; BEN AMOR, N. HLA-G regulators in cancer medicine: an outline of key requirements. **Tumor Biology**, v. 32, n. 6, p. 1071-1086, 2011.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. H-2 compatability requirement for T-cell-mediated 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;. **The Journal of experimental medicine**, v. 141, n. 6, p. 1427-1436, 1975.