



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
www.imunoparasito.ufu.br - E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034)3218-2333
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO BOVINO (BoLA) DE CLASSE I E PERFIL DE TNF- α E TGF- β 1 NA PLACENTA BOVINA DURANTE A GESTAÇÃO

Juliana Martins da Silva Gallo

Uberlândia

Julho de 2012



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
www.imunoparasito.ufu.br - E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034)3218-2333
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO BOVINO (BoLA) DE CLASSE I E PERFIL DE TNF- α E TGF- β 1 NA PLACENTA BOVINA DURANTE A GESTAÇÃO

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Imunologia e
Parasitologia aplicadas como
Requisito parcial a obtenção
do título de Doutora.

Juliana Martins da Silva Gallo

Orientador: Marcelo Emílio Beletti

Co-Orientador: Carlos Ueira Vieira

Uberlândia

Julho de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G172a
2012

Gallo, Juliana Martins da Silva, 1977-
Antígeno leucocitário bovino (BoLA) de classe I e perfil de
TNF- α e TGF- β 1 na placenta bovina durante a gestação / Juliana
Martins da Silva Gallo. -- 2012.
90 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Co-orientador: Carlos Ueira Vieira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Bovino - Gestação - Aspectos imunológicos - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Vieira, Carlos Ueira, 1981- . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Dedico essa tese a meu filho amado, Matheus, que veio iluminar à minha vida. Aos meus pais Humberto e Marta por todo apoio e auxílio prestados para concretização deste sonho. E ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo E. Beletti, pela paciência e orientação durante todos estes anos.

AGRADECIMENTOS

Escrever agradecimentos é relembrar bons momentos vividos e dificuldades superadas. Muitos me ajudaram direta ou indiretamente a manter o equilíbrio entre razão e emoção; afinal, foram muitos anos de trabalho para desenvolver esta pesquisa científica aqui apresentada. Assim, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos àqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.

A meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, um exemplo de amor à profissão, que conduz seus alunos e a ciência com excelência, garra, força, motivação, inspiração, ética e muito conhecimento. Agradeço pela oportunidade, orientação, compreensão, amizade, confiança e todos os ensinamentos transmitidos.

A meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira, pelos ensinamentos em biologia molecular, ideias, sugestões, paciência e correções ao trabalho

A meu filho, Matheus, que nasceu durante esta pesquisa, e me ensinou o que é o amor incondicional e verdadeiro.

A meus pais, Humberto e Marta, os quais amo muito e que estiveram sempre ao meu lado durante esta caminhada.

A minhas irmãs, Flávia e Anelise, pelo carinho, paciência e incentivo.

À Sabrina Vaz dos Santos e Silva pela amizade, companheirismo e auxílio durante minhas coletas de amostras no frigorífico e extrações de RNA.

À Patrícia Terra pela paciência e ensinamentos da qPCR. Sem você dificilmente a quantificação teria ocorrido.

À Bia pela paciência em me ensinar o beabá da PCR e a análise estatística da mesma, além, é claro, da disposição.

À Juliana, Marcília, Liliane minhas eternas amigas.

À Quequeq, minha Yorkshire, pelo companheirismo e dedicação durante toda minha jornada.

À minha prima, Akemi Leandra, pelo auxílio com a formatação da versão final desta tese. Apreendi muito sobre as ferramentas do WORD com você.

À Ketlen, que me ajudou com o abstract.

A família Kamimura, Regis e Cristina, amigos veterinários que me auxiliaram na realização da confraternização ao final deste trabalho.

Aos técnicos e funcionários do laboratório de Histologia o ICBIM-UFU: Eliete, Ester, Fabrício, Juscélia, Mariani, Marcelo Arantes, Roseane e Rui.

Aos colegas de pesquisa da Pós-Graduação do laboratório de Histologia do ICBIM-UFU.

À equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial a Thaise e Washington, pelo socorro prestado com a biologia molecular.

A equipe de trabalho do Laboratório de Reprodução Animal da FAMEV-UFU (Lucas, Benner, Aline, Tiago, Muller) que me forneceram os embriões produzidos *in vitro*.

Ao Frigorífico Luciana e a Juliane, Médica Veterinária responsável deste estabelecimento. Sem vocês nós não teríamos as amostras (placenta) fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Frigorífico Real por terem cedido os ovários para retirada dos ovócitos e realização da fertilização *in vitro*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da UFU pela oportunidade de fazer o doutorado.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, coordenador do (PPIPA), pelo apoio e dicas sugeridas para a finalização desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro desta pesquisa.

À banca examinadora (Prof. Antônio de Pinho, Profa. Jaqueline, Profa. Neide e Profa. Eloisa), bem como seus suplentes (Prof. Jacomini e Dra. Ana Cláudia), pelo tempo dedicado na leitura desta tese, além de suas sugestões e/ou críticas que foram muito bem vindas para o enriquecimento do trabalho.

A todos que, embora não citados nominalmente e que, com ações ou palavras, contribuíram para a execução de todas as etapas deste trabalho.

A todos,

O meu Eterno Obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	xi
LISTA DE QUADROS E FIGURAS.....	xvi
A. LISTA DE TABELAS	xvi
B. LISTA DE FIGURAS	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT	xx
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo principal:.....	3
2.2 Objetivos secundários:	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Aspectos da interação materno-fetal	4
3.2 Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I	7
3.3 Nomenclatura do MHC de classe I Bovino	9
3.4 Citocinas.....	9
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Comitê de Ética	16
4.2 Animais	16
4.3 Determinação da Idade Gestacional	17
4.4 Remoção dos Placentômas	17
4.5 Fertilização in vitro	18
4.6 Microscopia Confocal	20
4.7 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	21
4.8 Quantificação relativa de transcritos de MHC-I mRNA por PCR Tempo Real (qPCR)	23
4.9 Qualificação de transcritos de BoLA de classe I por PCR.....	25
4.10 Análise Estatística	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Imunofluorescência	26
5.2 Análise Molecular	29
5.2.1 Quantificação de Transcritos de BoLA total por qPCR	30
5.2.2 Quantificação de Transcritos de BoLA clássico (BoLA-N*) por qPCR.....	31
5.2.3 Quantificação de Transcritos de BoLA Não-Clássico (BoLA-NC*) por qPCR	32

5.2.4	Quantificação de Transcritos de BoLA não clássico gene 2 (BoLA-NC2) por qPCR..	33
5.2.5	Quantificação de Transcritos de BoLA não clássico gene 4 (BoLA-NC4) por qPCR..	34
5.2.6	Quantificação de Transcritos do Fator de Transformação do Crescimento beta um (TGF- β 1) por qPCR	35
5.2.7	Quantificação de Transcritos do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) por qPCR ..	36
5.2.8	Transcritos dos genes BoLA de classe I não clássicos (NC-1 e NC-3).....	37
6	DISCUSSÃO.....	38
6.1	Antígeno Leucocitário Bovino (BoLA) de classe I.....	38
6.2	Parte fetal da placenta	38
6.3	Parte materna da placenta e útero não gestante	41
6.4	Citocinas.....	42
6.5	Considerações finais.....	43
7	CONCLUSÃO	46
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	ANEXO I: PARECER DO CEUA.	60
	Anexo II: MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS.....	61
I.1.	ANTIBIÓTICO.....	61
I.2.	SOLUÇÃO DE PIRUVATO	61
I.3.	PBS	61
I.4.	BASE TCM 199 HEPES	62
I.5.	MEIO DE LAVAGEM DE OVÓCITOS	62
I.6.	BASE TCM 199 BICARBONATO.....	62
I.7.	MEIO DE MATURAÇÃO DE OVÓCITOS.....	63
I.7.1.	FSH (1 μ g/ μ L)	63
I.7.2.	LH (5 μ g/ μ L)	63
I.8.	BASES TALP-FERT e TALP-SPERM.....	64
I.9.	SOLUÇÃO DE PERCOLL 90% (Capacitação espermática)	64
I.9.1.	Solução 10X para Percoll.....	65
I.9.2.	Estoque CaCl ₂ (1M)	65
I.9.3.	Estoque MgCl ₂ (100mM)	66
I.10.	TALP-SPERM PARA PROCESSAMENTO DO SÊMEN.....	66
I.11.	Meio de fecundação – Meio Talp-Fert.....	66
I.11.1.	PHE.....	67

I.11.2. Heparina.....	67
I.12. BASE SOF.....	68
I.13. MEIO DE CULTIVO IN VITRO (SOF FINAL)	69
I.14. MEIO PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (H-SOF)	69
I.14.1. Meio H-SOF final (H-SOF estoque + 2,5% de SFB+ 5mg BSA/mL):.....	70

LISTA DE ABREVIACÕES

‰: por cento

°C: graus Celsius

APM: Moléculas de Processamento Antigénico

bFGF: Fator de Crescimento Fibroblástico básico

BLA: Blastocisto

BoLA: Bovine Leucocyte Antigen ou Antígeno Leucocitário Bovino

BoLA-N*: Antígeno Leucocitário Bovino classe I clássico

BoLA-N* R1: antígeno leucocitário bovino classe I clássico reverso 1

BoLA-N* R2: Antígeno Leucocitário Bovino classe I clássico reverso 2

BoLA-N* R3: Antígeno Leucocitário Bovino classe I clássico reverso 3

BoLA-NC: Antígeno Leucocitário Bovino classe I não-clássico

C: comprimento do embrião ou feto

CCO: complexo de cúmulos ovócito

CD3⁺: *Cluster of Differentiation* 3 ou Grupamento de Diferenciação 3

CD4⁺: *Cluster of Differentiation* 4 ou Grupamento de Diferenciação 4

CD8⁺: *Cluster of Differentiation* 8 ou Grupamento de Diferenciação 8

CD25⁺: *Cluster of Differentiation* 25 ou Grupamento de Diferenciação 25

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA: Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal

CL: corpo lúteo

cm: centímetro

CO₂: gás carbônico

C_T: *Cycle Threshold* ou Ciclo Threshold

CTLs: linfócitos T citotóxicos

CXCL8: quimiocina IL-8

D0: dia zero

D2: dia dois

D7: dia sete

D8: dia oito

D9: dia nove

DEPC: Dimetilpirocarbonato

DG: dias de gestação

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditionitrito

ECM: matriz extracelular

EGF: fator de crescimento epidermal

F: forward

FAMEV: Faculdade de Medicina Veterinária

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

FIV: fertilização *in vitro*

Foxp3⁺: forkhead box P3

G: gauss

GAPDH: desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato

G-CSF: Fator Estimulador de Célula de Granulócitos

h: hora

HE: coloração de hematoxilina-eosina

HLA: *Human Leucocyte Antigen* ou Antígeno Leucocitário Humano

HLA-G: Antígeno Leucocitário Humano G

IFN- α : interferon alfa

IFN- τ : interferon tau

IFN- γ : interferon gama

IFN-I: interferon do tipo I

IGF-I: Fator de Crescimento Semelhante a Insulina I

IGF-II: Fator de Crescimento Semelhante a Insulina II

IgG: imunoglobulina G

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-2: interleucina 2

IL-3: interleucina 3

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IL-10: interleucina 10

IL-17: interleucina 17

KCl: cloreto de potássio

KDR: domínio do receptor de quinase

LIF: Fator Inibidor de Leucemia

M: molar

mg: miligrama

MgCl₂: cloreto de magnésio

MHC: *Major Histocompatibility Complex* ou Complexo de Histocompatibilidade Principal

MHC I: Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I

min: minuto

μ L: microlitro

mL: mililitro

μ M: micro molar

μ m: micrômetro

mm: milímetro

MMLV-RT: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NC-1: gene 1 não clássico

NC-2: gene 2 não clássico

NC-3: gene 3 não clássico

NC-4: gene 4 não-clássico

NK: *natural killer* ou matadoras naturais

N₂L: nitrogênio líquido

Nm: nanômetro

OBS: observação

P4: progesterona

PAF: Fator Ativador de Plaquetas

pb: pares de base

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PG: período gestacional

PGE2: prostaglandina E2

PGF2 α : prostaglandina F2 α

pH: potencial de hidrogênio iônico

pmol: picomoles

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

R: reverso

rpm: rotações por minuto

RNA: ácido ribonucleico

RT: transcriptase reversa

SOF: Syntethic Oviductal Fluid ou Fluido sintético do oviduto

TAP-1: Transportador Associado ao Processamento de Antígeno 1

TAP-2: Transportador Associado ao Processamento de Antígeno 2

TBE: Tris/Borato/EDTA

TGF- α : Fator alfa de Crescimento Transformante

TGF- β : Fator beta de Crescimento Transformante

TGF- β 1: Fator beta de Crescimento Transformante isoforma 1

TGF- β 2: Fator beta de Crescimento Transformante isoforma 2

TGF- β 3: Fator beta de Crescimento Transformante isoforma 3

TGF- β RI: receptor I do Fator beta de Crescimento Transformante

TGF- β RII: receptor II do Fator beta de Crescimento Transformante

Th1: T *helper* ou T auxiliador 1

Th2: T *helper* ou T auxiliador 2

Th17: T *helper* ou T auxiliador 17

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

TNF-R1: receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral

TNF-R2: receptor 2 do Fator de Necrose Tumoral

Treg: T regulador ou T regulatória

U: Unidades

u: útero

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

UV: ultravioleta

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

A. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Idade gestacional estimada de fetos e embriões bovinos, segundo a fórmula de Rexroad et al. (1974). 18

Tabela 2 Primers utilizados na tese de doutorado intitulada “Antígeno Leucocitário Bovino (BoLA) de classe I e perfil de TNF- α e TGF- β na placenta durante a gestação”. 24

B. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Exemplo de validação do cDNA com o gene controle de referência (GAPDH) em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Amostras 1 e 6 = 6 a 7 meses; 2, 3, 4 e 5 = 8 a 9 meses de gestação; 1, 3 = carúnculas; 2, 4 e 6 = cotilédones. 23

Figura 2: A. Ovócito marcado com anticorpo MHC-I – FITC (verde). Observar a marcação em verde da zona pelúcida e dos cromossomos em anáfase I da meiose em azul. B. Blastocisto expandido marcado com anticorpo MHC-I – FITC (verde). Visualizar a zona pelúcida marcada em verde, o núcleo (azul) das células da massa celular interna (ICM) apontados pela seta branca. A seta vermelha aponta os núcleos (azul) das células do trofoblasto. C. Blastocisto eclodido marcado com anticorpo MHC-I – FITC (verde). Notar as células do trofoblasto marcadas em verde, o núcleo (azul) das células da massa celular interna (ICM) apontados pela seta branca. A seta vermelha aponta os núcleos (azul) das células do trofoblasto. Barra = 100 μ m. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 3: A. Baço marcado com anticorpo MHC-I – FITC (verde). Observar a intensa marcação em verde e os núcleos em azul. B. Útero vazio marcado com anticorpo MHC-I – FITC. Observar a lâmina própria bem marcada em verde e os núcleos em azul. C. Cotilédone com 21 dias de gestação marcado com anticorpo MHC-I – FITC com marcação fraca. D. Cotilédone com 21 dias de gestação corado com HE. E. Cotilédone com 2 a 3 meses de gestação marcado com anticorpo MHC-I – FITC com marcação fraca. F Cotilédone com 2 a 3 meses de gestação corado com HE. Setas indicam trofoblasto. Barra = 100 μ m. 28

Figura 4: A. Placentoma com 6 a 7 meses de gestação marcado com anticorpo MHC-I – FITC apresentando marcação fraca (verde) e os núcleos em azul. B. Placentoma com 6 a 7 meses de gestação corados com HE. C. Placentoma com 8 a 9 meses de marcado com

anticorpo MHC-I – FITC com marcação fraca (verde) e os núcleos em azul. D. . Placentoma com 8 a 9 meses corado com HE. Setas indicam trofoblasto. Barra = 100µm. 29

Figura 5: Quantificação relativa de transcritos de BoLA cujos primers amplificam todos os alelos clássico e não clássico em carúncula (A e B) e cotilédone (C e D) bovinos durante todos os períodos gestacionais (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). A média dos úteros vazios foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. U = útero não gestante. Bla = blastocisto. 31

Figura 6: Quantificação relativa de transcritos de BoLA clássico em carúncula (A) (Bonferroni, $P < 0,05$) e cotilédone (B) (Teste Bonferroni, $P < 0,05$) bovinos durante todos os períodos gestacionais. A média dos úteros vazios foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). BoLA-N* = MHC classe I clássico bovino, U = útero não gestante. Bla = blastocisto. 32

Figura 7: Quantificação de transcritos do BoLA não clássico em carúncula (A) e cotilédone (B) bovinos durante todos os períodos gestacionais (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). O útero foi usado como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e o blastócito para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. BoLA-NC* = MHC classe I não-clássico bovino, U = útero não gestante. Bla = blastocisto. 33

Figura 8: Quantificação relativa de transcritos de BoLA não clássico gene 2 (NC-2) em carúncula (A) e cotilédone (B) (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$) bovinos durante todos os períodos gestacionais. A média das carúnculas com 1 mês de gestação foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. BoLA-NC2 = MHC de classe I não-clássico gene 2, U = útero não gestante. Bla = blastocisto. 34

Figura 9: Quantificação relativa de transcritos de BoLA não clássico gene 4 (NC-4) em carúncula (A) e cotilédone (B) (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$) bovinos durante todos os períodos gestacionais. A média das carúnculas com um mês de gestação foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos

para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. BoLA-NC4 = MHC de classe I não-clássico gene 4, U = útero não gestante. 35

Figura 10: Quantificação relativa de transcritos de TGF- β 1 em carúnculas (A) e cotilédones (B) bovinos durante todos os períodos gestacionais (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). A média dos úteros vazios foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. TGF-beta-1 = fator de crescimento tumoral beta 1. U = útero não gestante. Bla = blastocisto. 36

Figura 11: Quantificação relativa de transcritos de TNF- α em carúnculas (A) e cotilédones (B) bovinos durante todos os períodos gestacionais (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). A média das carúnculas com 1 mês de gestação foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos cotilédones com 1 mês de gestação para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. U = útero não gestante. Bla = blastocisto. 37

Figura 12: Exemplo de eletroforese em gel de agarose 1,5% do gene não clássico 3 (NC3) do antígeno leucocitário bovino (BoLA) de classe I em carúnculas e útero bovinos. Legenda: M = marcador de 100pb, amostras 1, 12 e 15 = carúnculas com até 1 mês, 4, 9 e 10 = carúnculas com “2 a 3” meses, 5, 13 e 14 = carúnculas com “4 a 5” meses, 2, 6 e 8 = carúnculas com “6 a 7” meses, 3, 7 e 16 = carúnculas com “8 a 9” meses de gestação e 11 = útero não gestante... 37

ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO BOVINO (BoLA) DE CLASSE I E PERFIL DE TNF- α E TGF- β 1 NA PLACENTA BOVINA DURANTE A GESTAÇÃO

RESUMO

Com o intuito de entender os mecanismos imunofisiológicos da gestação em vacas esta tese teve como objetivo avaliar a quantidade de transcritos do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) de classe I clássico (BoLA-N*) e não clássico (BoLA-NC*), bem como das citocinas TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) e TGF- β 1 (Fator de Crescimento Transformador beta 1) em úteros não gestantes, carúnculas, blastocistos e cotilédones bovino durante todo o período gestacional. Utilizou-se a quantificação por qPCR, a qualificação (presença ou ausência) via RT-PCR convencional e a imunofluorescência com anticorpo primário monoclonal MHC de classe I ovino. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de tecido de linfonodo e/ou baço bovino em todos os ensaios experimentais. A quantidade de transcrito de BoLA de classe I clássico e não clássico foi pequena (*fold change* variando de 0 a 3) nos blastocistos e cotilédones. Nos cotilédones a transcrição de BoLA-NC* foi maior do que a transcrição de BoLA-N*. Nos blastocistos houve maior transcrição de BoLA-N* do que de BoLA-NC*. BoLA-NC2 transcreveu mais nos blastocisto do que nos cotilédones. BoLA-NC4 não transcreveu nos blastocistos. Os cotilédones transcreveram mais BoLA-NC4 do que BoLA-NC2. As carúnculas apresentaram grandes quantidades de transcritos (*fold change* variando de 5 a 400), que foram maiores nos períodos gestacionais de “8 a 9” para BoLA-N* e até 1 mês para BoLA-NC*. A transcrição de BoLA-NC2 foi maior do que a de BoLA-NC4 nas carúncula. O útero não gestante teve menor quantidade de transcritos de BoLA-N* e BoLA-NC* do que nas carúnculas. Não há transcrição de BoLA-NC2 no útero não gestante, mas há uma pequena quantidade de transcritos de BoLA-NC4 neste tecido. A presença de grandes quantidades de transcritos (*fold change* variando de 50 a 500) de BoLA-NC2 nas carúnculas, com idade gestacional maior do que um mês, parece proteger o feto da rejeição. Nas carúnculas parece existir um pico de transcrição de TGF- β 1 no sexto e sétimo meses de gestação, justamente quando o feto tem seu maior crescimento, sinalizando um provável envolvimento desta citocina neste fenômeno. O TNF- α surge em maior quantidade no final da gestação, tanto nas carúnculas quanto nos cotilédones, demonstrando o início de uma reação inflamatória, necessária para a adequada expulsão do concepto e da placenta durante o parto.

Palavras-Chave: *Bos taurus*, cotilédone, carúncula, útero, MHC-I

BOVINE LEUCOCYTE ANTIGEN (BoLA) CLASS I AND PROFILE OF TNF- α AND TGF- β 1 IN BOVINE PLACENTA DURING PREGNANCY

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the amount of transcripts from the Major Histocompatibility Complex (MHC) class I classical (BoLA-N *) and non-classical (BoLA-NC*), as well as of TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) and TGF- β 1 (Transforming Growth Factor beta 1) cytokines in bovine non-pregnant uterus, caruncles, cotyledons and blastocysts throughout the pregnancy period, in order to understand the immune and physiological mechanisms that occur in pregnancy in cows. The samples were analyzed by qPCR, the qualification (presence or absence) by conventional RT-PCR and the immune fluorescence with sheep monoclonal antibody against MHC class I. As positive control we used a sample of tissue from the bovine lymph node and/or spleen in all experimental tests. The amount of transcript BoLA-N* and BoLA-NC* was small (fold change 0 to 3) in blastocysts and cotyledons. Cotyledons transcription BoLA-NC* is greater than the transcription of BoLA-N*. Blastocysts transcription of BoLA-N* was higher than BoLA-NC*. Blastocysts transcribed more BoLA-NC2 than in cotyledons. Blastocysts not transcribed BoLA-NC4. Cotyledons transcribed BoLA-NC4 more than BoLA-NC2. The caruncles showed large amounts of transcripts (fold change 5 to 400), which were higher for pregnancy period of "8-9" month to BoLA-N* and one month for BoLA-NC*. Caruncles BoLA-NC2 transcription was higher than the BoLA-NC4. The uterus non pregnant had fewer transcripts BoLA-N* and BoLA-NC* than in caruncles. The uterus non pregnant no have transcripts of BoLA-NC2, but they had a small amount of transcripts of BoLA-NC4. Caruncles had large amounts of transcripts (fold change 50 to 500) of BoLA-NC2 with pregnancy age greater than one month; those are seemed to protect the fetus from rejection. TNF- α appears in greater amount in late gestation (8 and 9 months), showing the beginning of an inflammatory reaction, necessary to the adequate removal of the fetus and the placenta during delivery. Since TGF- β 1 has a peak of expression in the sixth and seventh months of gestation, just when the fetus has its greatest growth, demonstrating a probable involvement of this cytokine in this phenomenon.

Key-Words: *Bos taurus*, cotyledon, caruncle, uterus, MHC-I

1 INTRODUÇÃO

Considerando-se a importância econômica dos bovinos para a sociedade, pesquisadores e médicos veterinários têm procurado aprimorar o manejo desta espécie, a fim de obter maior eficiência produtiva e reprodutiva por meio das biotecnologias da reprodução, que representam um importante papel neste processo (LACERDA, 2006). Assim, a concepção e a gestação bem sucedidas não dependem somente do número suficiente de espermatozoides para fecundarem o ovócito na tuba uterina, mas também de mecanismos suportes da imunidade que garantam um resultado próspero. Deste modo a fecundação é seguida pela atração e ativação de células imunes (SCHUBERTH et al., 2008) as quais persistirão durante todo o período gestacional.

Nos ruminantes a placenta é classificada como sinepiteliocorial, policotiledonária e vilosa, apresentando áreas especializadas de aposição e proliferação das membranas materno-fetais, os placentoma, que constituem a união entre a carúncula e o cotilédone (WOOD e BURTON, 2008). Nesta interface ocorrem as trocas metabólicas indispensáveis para o desenvolvimento do conceito (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Os trofoblastos, células integrante da placenta fetal, são células que definem o limite entre mãe e feto (JOHNSON, 1996; MOFFETT; LOKE, 2006; WOOD e BURTON, 2008). Essas células são derivadas da camada externa do blastocisto (GRUNERT, BIRGEL, 1982; MOFFETT; LOKE, 2006) e podem expressar RNA mensageiro (mRNA) que são codificados pelas vias clássicas e não-clássicas dos genes do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I) (MOFET e LOOK, 2006; DAVIES et al., 2006; MCLAREN, 2006).

Acredita-se que a perda da expressão de MHC-I sirva para proteger a placenta do ataque do sistema imune materno (DAVIES et al., 2006). Esta supressão seria importante para evitar a rejeição do feto pelos tecidos maternos (DAVIES et al., 2000). Enquanto que, ao final do período gestacional seria interessante que esta glicoproteína voltasse a ser expressa para auxiliar no nascimento do feto e posterior expulsão da placenta fetal, evitando, deste modo, a necessidade de intervenção cirúrgica para a retirada do conceito, bem como a retenção da placenta que pode causar desde infecções, infertilidade levando, até mesmo, a morte do animal.

Pouco se conhece a respeito da influência de BoLA clássico e, principalmente, do não clássico referentes a estudos de uma gestação natural e normal em bovinos (MURPHY et al., 2009), pois a maioria das pesquisas em bovinos é focada na parte patológica e/ou em infecções por bactérias, vírus e protozoários. O conhecimento da resposta imunológica

fisiológica materna ao conceito é muito importante para o entendimento e funcionamento da gestação. Deste modo, melhoraremos nossas tecnologias reprodutivas, como clonagem, transferência de embrião e inseminação artificial, bem como a poderemos propor e usar novas drogas, obtendo, assim, um maior sucesso reprodutivo destes animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal:

Avaliar a expressão do antígeno leucocitário bovino (BoLA) de classe I clássico e não clássico em placentas bovinas durante todo o período gestacional, pela quantificação dos transcritos por transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

2.2 Objetivos secundários:

Quantificar por qPCR, as citocinas TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e TGF- β 1 (fator de crescimento transformado beta um) na busca de indícios do perfil imunológico que ocorre na placenta bovina durante o desenvolvimento embrionário-fetal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos da interação materno-fetal

Aspectos reprodutivos, tais como atraso na idade ao primeiro parto, falhas na detecção de cio, aumento no intervalo de partos, entre outros, estão diretamente relacionados à lucratividade do plantel de bovinos (HAFEZ e HAFEZ, 2004; WOOD e BURTON, 2008). Detalhes importantes do desenvolvimento gestacional permanecem obscuros, especialmente os referentes à placenta (AUSTGULEN, 2004). Estes podem comprometer o tamanho do feto ao nascimento (BOOS, 2003) ou devido à retenção da placenta, ocasionar uma subsequente infertilidade e até mesmo à morte do animal (WOOD e BURTON, 2008).

A maioria da perda embrionária em mamíferos ocorre durante o início da gestação (EDEY, 1969; SHORT, 1984) devido a falhas genéticas, infecção e outros agentes inflamatórios que estão envolvidos com os leucócitos maternos e fatores imunes que incluem citocinas (BURTON e JAUNIAUX, 2004; CALLEJA-AGIUS et al., 2012) e o complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Na espécie bovina, taxas de 90% de fertilização são seguidas por índices de nascimento de apenas 50 a 60%, com a maioria das perdas causadas pela morte embrionária no terço inicial da gestação (MAURER, CHENAULT, 1983; SREENAN, DISKIN, 1984), fato este que compromete a eficiência reprodutiva em bovinos (MARQUES JÚNIOR, 2006).

Reações imunes prematuras induzem a ovulação, seleção de espermatozoides, tolerância imunológica aos antígenos paternos, a reestruturação do endotélio para implantação e placentação (SUGAWARA et al., 2010), bem como o suporte imunológico para o desenvolvimento do tecido fetal. Por isso, a fecundação tem sido considerada o início da comunicação entre embrião e organismo materno, que permite uma gestação a termo favorável ao êxito (ROBERTSON, 2005; SCHUBERT et al., 2008). Após a fecundação o embrião passa a dividir-se até o estágio de mórula, e com o desenvolvimento da blastocela circundada pelas células do trofoblasto ocorre a formação do blastocisto (HAFEZ e HAFEZ, 2004; WOOD e BURTON, 2008). Em ungulados, o blastocisto antes de se implantar na parede uterina para formar a placenta, passa pelo processo de elongação antes de aderir ao endométrio (DORÉ et al., 1995).

O blastocisto é composto por células da camada externa do trofoblasto (GRUNERT, BIRGEL, 1982; MOFFETT; LOKE, 2006), representa a camada responsável pelas trocas entre mãe e feto (LAIESER, KAUFMANN, 1994). Subpopulações de células trofoblásticas

bovinas podem expressar mRNA que são codificados pelas vias clássicas e não-clássica dos genes do MHC de classe I (DAVIES et al., 2006; MOFFETT; LOKE, 2006). Expressam genes do MHC e semelhantes ao MHC (*MHC-like*), que são ligantes potenciais para receptores nas células *natural killer* (NK) uterinas, nos linfócitos e nos mielomonócitos (MOFFETT, LOKE, MCLAREN, 2006; MOFFETT; LOKE, 2006). Acredita-se que o contato íntimo entre o endométrio e o corioalantóide, no primeiro trimestre da gestação em ruminantes, cause uma supressão da expressão do MHC de classe I no trofoblasto (HILL et al., 2002). Esta supressão seria importante para evitar a rejeição do feto pelos tecidos maternos. A expressão de antígenos trofoblásticos do MHC-I retorna no terceiro trimestre da gestação no bovino (DAVIES, FISHER, SCHLAFFER, 2000).

A implantação é um processo complexo que envolve vários fatores bioquímicos e modificações moleculares, tais como o contato entre células com diferentes origens, invasão celular e/ou fusão dependendo da espécie e tipo de placentação, proliferação de células endometriais e reorganização da matriz extracelular (ECM) (SUGAWARA et al., 2010). No endométrio dos ruminantes estes eventos ocorrem em uma área limitada denominada carúncula (KLISCH et al., 1999; HASHIZUME et al., 2007; SUGAWARA et al., 2010).

A placenta é formada quando as membranas fetais se tornam intimamente associadas com a parede uterina para facilitar, fisiologicamente, as trocas de gases, nutrientes e produtos residuais (MOFFETT; LOKE, 2006). Nos ruminantes a placenta é classificada como sinepiteliocorial, policotiledonária e vilosa, apresentando áreas especializadas de aposição e proliferação das membranas materno-fetais, os placentoma, que constituem a união entre a carúncula e o cotilédone. Nesta interface ocorrem as trocas metabólicas indispensáveis para o desenvolvimento do conceito (HAFEZ e HAFEZ, 2004; WOOD e BURTON, 2008).

As carúnculas ficam dispostas em quatro fileiras, sendo duas ventrais e duas dorsais, ao longo do corno uterino (ROBERTS, 1986). Há um aumento no número de placentoma com o avançar da gestação, de 89 para 173, do início à metade do período, respectivamente, para depois diminuir de 162 para 77, quando da gestação a termo (RAM, CHANDRA, 1984).

A placentação promove o reconhecimento materno da gestação e a sobrevivência do feto através da secreção de interferon-tau (IFN- τ), o qual inibe a regressão do corpo lúteo (CL) através da supressão endometrial de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$). O IFN- τ também evita a expressão dos receptores de ocitocina endometriais e afeta a síntese de citocinas referentes à imunomodulação, prevenindo, assim, a rejeição do conceito. Também está relacionado à adesão do blastocisto a superfície do endométrio (IGWEBUIKE, 2005). Subdesenvolvimento

de cotilédones e a perda da formação de vilos são características morfológicas que também sugerem a rejeição materna ao tecido placentário (DENT, McGOVERN, HANCOCK, 1971).

Os macrófagos fetais, conhecidos na espécie humana como células de Hofbauer, se originam tanto do mesênquima coriônico no início da gestação, quanto dos monócitos fetais derivados da medula óssea. Produzem citocinas pró-inflamatórias e atuam na apresentação de antígenos, como células de defesa (SCHLAFFER, 2000). Schlafer (2000) observou a presença de poucos macrófagos fetais nos vilos cotiledonares em fetos com menos de seis meses de idade, mas aos oito meses o número aumentou dez vezes. As prováveis funções a eles atribuídas são de defesa na placenta fetal e transporte de microrganismos para sítios de inflamação da placenta para o feto via veias umbilicais (SCHLAFFER, 2000).

Linfócitos são observados no epitélio luminal uterino no início da gestação em vacas, diminuindo substancialmente com o tempo, talvez por imunossupressão; a camada de células do trofoblasto age como uma barreira placentária evitando que células imunocompetentes causem dano ao embrião (AMOROSO, PERRY, 1975; KING, ATICKINSON, ROBERTSON, 1982).

A placenta bovina normalmente é expelida em 12 horas e sua retenção pode ser decorrente da falta de desprendimento dos cotilédones das carúnculas, ou estar relacionada a dificuldades mecânicas em expelir as membranas fetais previamente desconectadas, como na atonia uterina. Ambos os mecanismos podem coexistir (EILER, 1997).

O crescimento, a maturação e a liberação placentária dependem da homeostase tecidual (HAFEZ e HAFEZ, 2004; WOOD e BURTON, 2008), bem como da proliferação celular e da apoptose ou morte celular programada (BENETONE, 2005). Barreto Filho e Marques Júnior (1993) coletaram placentoma durante várias fases gestacionais, inclusive pós-parto, e de várias regiões do útero (proximal, medial e distal). Eles observaram que o número de células epiteliais nas criptas carunculares diminuiu com o avanço da gestação, independente da região uterina, sugerindo sua relação com a liberação placentária. O número de linfócitos T e B, bem como a atividade quimiotática e fagocítica dos leucócitos estão reduzidos do placentoma, em vacas com retenção placentária (GUNNINK, 1984).

Benetone (2005) detectou células apoptóticas, na placenta de búfalas, por meio de anticorpos monoclonal anti-M30 CytoDeath e policlonal anti-caspase-3 clivada ao longo de todo período gestacional, com um aumento significativo na placenta a termo. Observou, também, através do antígeno nuclear de proliferação celular, células em proliferação ao longo da gestação, com diminuição celular significativa na fase final da gestação. O autor inferiu

uma possível correlação entre o desenvolvimento, a senescência e a liberação de placentomas com o fenômeno da apoptose.

3.2 Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I

O complexo principal de histocompatibilidade (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; TZARD, 2004; ABBAS et al., 2008), enquanto as de classe II os apresentam nas células T auxiliaadoras CD4⁺ (ABBAS et al., 2008).

Acredita-se que a perda da expressão de MHC-I sirva para proteger a placenta do ataque do sistema imune materno. Os genes MHC-I codificam moléculas clássicas (classe Ia) e não-clássicas de MHC-I (classe Ib). Os genes não clássicos de MHC-I são menos polimórficos e tem expressão celular restrita (DAVIES et al., 2006). Um exemplo de gene de MHC-I não clássico é o HLA-G, o qual é codificado pelo complexo de antígeno leucocitário humano (HLA). Nos humanos o HLA-G é expresso especificamente em citotrofoblastos invasivos e pode proteger estas células do ataque de linfócitos T e/ou células NK (PARK et al., 2004).

As células trofoblásticas interplacentomais expressam os genes do MHC-I, clássico e não clássico (DAVIES et al., 2006). Segundo experimentos realizados por Davies e colaboradores (2006), a proporção de MHC-I transcritos codificados em MHC-I de loci não clássico foi significativamente maior nas células trofoblásticas do que nas células mononucleares do sangue periférico. Estes autores verificaram, ainda, que nas células trofoblásticas 34% a 79% do MHC-I transcrito era codificado em loci MHC-I não clássico. Um alto nível de expressão de genes MHC-I não clássicos pode estar associado com o aumento da proteção do feto contra a rejeição imunológica materna (DAVIES et al., 2006).

A expressão de MHC classe I ocorre no segundo e terceiro trimestres da gestação dos mamíferos (PHILPOTT et al., 1988; GOGOLIN-EWENS et al., 1989; LOW et al., 1990). No segundo trimestre de gestação em bovinos, não há expressão de MHC de classe I pelos trofoblastos, tanto dos placentomas como das áreas interplacentomais, até o quinto mês de gestação, quando há um aumento de expressão do MHC de classe I no trofoblasto da região

interplacentomal (LOW et al., 1990; DAVIES FISHER, SCHLAFFER, 2000). O contato íntimo entre a placenta e as células maternas tem seu início entre a quarta e quinta semana de gestação na vaca, devido a interdigitação dos microvilos nas áreas interplacentomais e desenvolvimento dos placentomas (KING, ATKINSON, ROBERTSON, 1981; NODEN, de LAHUNTA, 1990).

A expressão de antígenos trofoblásticos do MHC-I ocorre no terceiro trimestre da gestação em bovinos (DAVIES, FISHER, SCHLAFFER, 2000), com a expressão de antígenos clássicos do MHC-I (DAVIES et al., 2006). A primeira aparição da expressão de MHC-I ocorre durante o sexto mês de gestação e é limitada às regiões interplacentomal e arcada do placentoma, não ocorrendo expressão na região dos seus vilos/crípta, a qual corresponde à área de íntimo contato entre o feto e a mãe (JOOSTEN, SANDERS, HENSEN, 1991; JOOSTEN, HENSEN, 1992).

Existem diferenças imunológicas entre as placentas de fetos naturais e clonados. Nas placentas de bovinos clonados, Hill et al. (2002) observaram aumento de linfócitos T agregados localizados tanto na superfície quanto no estroma profundo nas áreas intercotiledonárias e cotiledonárias do endométrio. Já nas placentas da gestação de fetos naturais, os mesmos autores encontraram menos agregados de linfocitários. Este aumento do número de linfócitos na gestação de clones e sua distribuição no endométrio sugerem um recrutamento ativo na resposta a um estímulo antigênico forte. Esta relação temporal da infiltração linfocitária com falência gestacional evidencia a rejeição materna à gestação (HILL et al., 2002).

Hill et al. (2002) verificaram a expressão de MHC de classe I em gestações naturais e de clones, aos 34 a 63 dias de gestação em vacas. Constataram que a expressão do MHC-I, no endométrio materno foi, aparentemente, similar em ambas às gestações. Apenas uma diferença foi observada por estes pesquisadores: a grande abundância de epitélio endometrial colunar positivo para MHC-I na gestação de clones. Em relação ao trofoblasto de fetos clonados averiguaram que o MHC-I estava disseminado em todas as gestações estudadas (8/8).

A expressão de MHC-I em gestação de clones foi geralmente acompanhada pelo aumento significativo do número de linfócitos T CD3⁺ endometrial. Este aumento sugere que a imunologia gestacional de clones é dramaticamente alterada, visto que em gestações naturais o mesmo não ocorre. O número e a distribuição anormais de linfócitos T podem ser uma das causas ou sintomas da alta mortalidade embrionária observada na gestação de clones (HILL et al., 2002).

3.3 Nomenclatura do MHC de classe I Bovino

O MHC de classe I bovino é nomeado de antígeno leucocitário bovino, ou seja, BoLA (*Bovine Leucocyte Antigen*) que codifica 17 antígenos controlados pelo locus do BoLA A, enquanto o MHC de classe II bovino é controlado pelo locus BoLA-D (AMORENA e STONE, 1980; LEVEZIEL e HINES, 1984; DAVIES et al., 1997). O locus do BoLA-A possui alelos clássicos e não clássico, nomeadamente BoLA-N* e BoLA-NC*, respectivamente (DAVIES et al., 2006; 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 (BIRCH et al., 2008). Enquanto que os loci NC2 e NC3 são monomórficos e expressos em altas concentrações no trofoblasto (BIRCH et al., 2008). 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). Pouco se sabe a respeito do MHC-I não clássico bovino, mas estudos em humanos e camundongos demonstraram que as isoformas não clássicas do MHC de classe I interagem com receptores inibitórios de citocinas ou de células NK para inibir a resposta imune materna (DAVIES et al., 2006). As isoformas solúveis humanas (ex. HLA-G) são fatores imunossupressivos e induzem a apoptose de células TCD8⁺ ativada (DAVIES et al., 2006). 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).

3.4 Citocinas

Durante a gestação, o sistema imune materno é desafiado com moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) paternas associadas a células fetais que atingem o seu sangue periférico (HATTHACHOTE, GILLESPIE, 1999; HILL; CHOI, 2000). A sensibilização materna contra tais antígenos é orientada pelos linfócitos Th1, que secretam grande quantidade de interleucina- 2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), que auxiliam na ativação dos linfócitos T CD8⁺ dirigidos contra células fetais que expressam moléculas de MHC paternas. Estas células T CD8⁺ sensibilizadas, além de danificarem diretamente os anexos fetais, amplificam a resposta local por perpetuar a secreção de citocinas pró-inflamatórias (ZENCLUSSEN et al., 2005, MARZI et al., 2000), tais como IFN- γ em

humanos (CROY et al., 2006), interferon-tau (INF- τ) em ruminantes (ROBERTS, 2007; SPENCER et al., 2007) e fator de necrose tumoral (TNF- α) em ambas as espécies.

Estas citocinas, por aumentarem o poder microbicida dos macrófagos e das células NK uterinas (ZENCLUSSEN et al., 2005), estão envolvidas em infartos placentários e descolamento prematuro da placenta, determinantes de sofrimento fetal e elevado risco de óbito perinatal (HILL; CHOI, 2000). Entretanto, para evitar a produção de citocinas embriotóxicas, a mãe deve passar, por um tempo determinado, por mudanças fisiológicas necessárias para dar suporte à gestação. Neste sentido, o cortisol, o estrogênio e, principalmente, a progesterona são responsáveis pela geração de uma rede de citocinas regulatórias, tais como a IL-10 e fator β de crescimento transformante (TGF- β), que dará suporte ao desenvolvimento fetal na cavidade uterina (HATTHACHOTE, GILLESPIE, 1999; LIM et al., 2000; POLANCZYK et al., 2004).

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória secretada no útero durante o início da gestação. É produzido abundantemente pelas células NK (TATO et al., 2004) uterinas no endométrio e também no trofoblasto de algumas espécies (CROY et al., 2006). Na gestação normal de camundongos o IFN- γ tem por função começar o remodelamento vascular do endométrio, a angiogênese no sítio de implantação e a manutenção do componente decidual da placenta. Em animais de produção e em humanos, desvios neste processo contribuem para complicações gestacionais sérias como a perda fetal ou pré-eclampsia (CROY et al., 2006).

IFN- γ tem amplas funções na ativação das respostas imune inata e adquirida para vírus e tumores, na produção de transcritos de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose e processamento e apresentação de antígeno (MURPHY et al., 2009). Apesar disso, as células trofoblásticas de roedores e humanos apresentaram respostas deprimidas para IFN- γ , o que reflete a resistência destas células para a ativação mediada pelo IFN- γ na expressão de antígenos transplantados do MHC de classe II (MURPHY, TOMASI, 1998; van den ELSEN et al., 2000). A perda de antígenos do MHC de classe II nos trofoblastos é responsável por facilitar a sobrevivência do conceito semi-alogênico na presença de linfócitos maternos (HUNT, 2006). Por isso, o IFN- γ é rotineiramente testado na pesquisa da gestação para estabelecer as divergências da gestação normal e saudável (MURPHY et al., 2009).

A ausência da produção de IFN- γ pelos trofoblastos de equinos e ruminantes é um indicativo de que a síntese de IFN- γ não é uma característica universal nas espécies que têm placentação epiteliocorial (GRUNIG, ANTCZAK, 1995; ROBERTS, 2007; SPENCER et al., 2007).

A descoberta da abundante produção de interferon pelas células trofoblásticas de animais de produção foi de grande importância. O INF- τ de ruminantes, o primeiro a ser descrito, tem forte atividade antiviral clássica (TZARD, 2004). Contudo o INF- τ tem outra atividade maior. Ele foi considerado semelhante à progesterona e participa do reconhecimento materno da gestação, conectado a manutenção do CL. Deste modo, o INF- τ auxilia na produção de progesterona e na continuação da gestação (ROBERTS, 2007; SPENCER et al., 2007), ou seja, este fator atua no reconhecimento do embrião pelo organismo materno, inibe os fatores relacionados com a luteólise e consegue manter a gestação (THATCHER et al., 2001). O atraso ou a redução de sua secreção levam a morte prematura do embrião (ARNOLD et al., 2000), principalmente nos produzidos *in vitro* e posteriormente criopreservados, pois a criopreservação leva a menor secreção de INF- τ , quando comparada aos embriões produzidos *in vitro* e transferidos a fresco (ARAÚJO et al., 2005).

TGF- β é uma citocina pleiotrópica que age em todos os tipos de células e regula uma grande variedade de processos, incluindo embriogênese, cicatrização, adesão celular, migração celular, formação de EMC e morte celular (MUNSON et al., 1996; JAVELAUD, MAUVIEL, 2004; LIN et al., 2006; HONG et al., 2010). Ela induz os trofoblastos a deixarem o ciclo celular e formarem células multinucleadas, que são resultantes da fusão dos citotrofoblastos invasivos, e representam o equivalente *in vivo* das células gigantes na placenta humana (GRAHAM et al., 1992).

Graham et al. (1992) mostraram que durante o primeiro trimestre da gestação humana ocorreu marcação imunohistoquímica para TGF- β na ECM, bem como nos vilos coriônicos, sinciciotrofoblasto e ECM vilosa. Esta marcação foi ausente nos leucócitos da decídua e epitélio glandular, enquanto que na placenta a termo visualizou-se marcação intracelular das células deciduais. Esta diferença entre marcação de TGF- β durante o início da placentação e ao final da mesma pode ser devido a uma taxa mais elevada na síntese e/ou uma taxa mais lenta de liberação deste fator de crescimento pelas células deciduais a termo, bem como pela relativa escassez da ECM na decídua a termo, pois a ECM decidual pode servir como um local de armazenamento para TGF- β (GRAHAM et al., 1992). Em bovinos observou-se maior expressão deste fator de crescimento no endométrio do corno gestante durante o período de peri-implantação do blastocito bovino (SUGAWARA et al., 2010).

No endométrio de ratas, durante o ciclo reprodutivo, observou-se que o TGF- β não possui ação degradante e de remodelação endometrial, sendo estes processos controlados por alterações hormonais, na razão de estrógeno e progesterona. Verificou-se, ainda, que a presença desta citocina no epitélio endometrial de ratas foi importante para a receptividade

materna e reação de fixação/implantação do blastocisto. Constatou-se que a sinalização de TGF- β possui uma baixa regulação no processo de invasão do trofoblasto ao endométrio de ratas (LIN et al., 2006). Os receptores de TGF- β (TGF- β RI e TGF- β RII) foram mais importantes durante o período de preparação uterina do que no processo de invasão (LIN et al., 2006). A presença deste fator de crescimento na fase inicial da gestação ocorre de forma diferente dependendo da espécie de mamíferos na qual ela foi pesquisada.

TGF- β pode desempenhar, também, um papel importante na diferenciação de linfócitos Tregs, pois linfócitos T *naïves* humanos são diferenciados em linfócitos regulatórios Foxp3⁺ na presença de TGF- β (YAMAGIWA et al., 2001; FARIA et al., 2008; SAITO et al., 2010), além de apresentarem marcadores de superfície similares aos linfócitos Tregs e terem efeito inibitório *in vivo* (CHEN et al., 2003; FARIA et al., 2008).

Os efeitos de TGF- β nas placentas é determinado pelos isotipos específicos (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), bioatividade dos ligantes, tipo de receptor expresso sobre as células e a presença de outros fatores de crescimento e citocinas que modulam a ação de TGF- β (CHEIFETZ et al., 1990; MUSON et al., 1996). Este fator de crescimento é sintetizado e secretado pelas células do trofoblasto e epiteliais endometriais (MUSON et al., 1996).

TGF- β e suas isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 estão localizadas no placentoma bovino, mais especificamente na interface materno-fetal e medeiam coordenadamente o desenvolvimento do córion e do epitélio endometrial através de ações parácrinas e autócrinas (MUSON et al., 1996). O TGF- β 2 presente no vilo coriônico e na decídua, identificado através da análise imunohistoquímica, foi indicativo de uma função proliferativa e de diferenciação do trofoblasto para esta isoforma (GRAHAM ET AL., 1992). A isoforma TGF- β 3 possui origem fetal (MUSON ET AL., 1996) distribuição esta que também ocorre na espécie humana (DIJKE et al., 1988) e em camundongos (DAS et al., 1992).

Doré et al. (1995) verificaram que durante o processo de alongamento do blastocisto ovino há um aumento da expressão das isoformas 1 e 2 de TGF- β , enquanto que a isoforma 3 não estava envolvida na formação precoce da placenta devido a sua ausência durante o primeiro mês da placentação. Observaram, também, baixa expressão de TGF- β 1 após o 27º dia da gestação devido a um reflexo da diminuição da taxa de crescimento do alantoide, concluindo que houve envolvimento das isoformas 1 e 2 na formação da porção fetal da placenta ovina.

IL-10 é expressa por várias células imunes, incluindo linfócitos T e B e macrófagos. Os efeitos imunossupressores desta citocina incluem a inibição de produção de citocinas por linfócitos T, inibição da apresentação de antígeno e inibição da expressão de moléculas co-

estimulatórias por células apresentadoras de antígeno (PESTKA et al., 2004). As células CD4⁺ CD25⁺ produzem IL-10, mas esta atividade não tem sido demonstrada na supressão *in vitro* (TAKAHASHI et al., 1998; FARIA et al., 2008). Estudos experimentais têm detectado altas concentrações de IL-10 no soro de animais que apresentam tolerância ao transplante renal, sugerindo um papel regulatório dessa citocina e propondo que a presença de IL-10 nesse microambiente poderia contribuir para a geração e expansão de células Tregs (HARA et al., 2001).

Estudos demonstram a importância da IL-17 em diversas respostas fisiopatológicas, por exemplo, estimular células T na imunidade celular e humoral alérgico-específica, induzir a maturação de células dendríticas, estimular a expressão de citocinas pelos diferentes tipos celulares, induzir a produção de moléculas pro-angiogênicas (PONGCHAROEN et al., 2006; SHEN; GAFFEN, 2008), além de recrutar neutrófilos no sítio da resposta imune através da indução de Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF) e quimiocinas indutoras de neutrófilos, como CXCL8/IL-8 (DRAGON et al., 2008). A indução de IL-6 é requerida pelo TGF- β para induzir a geração de IL-17, células Th-17 pró-inflamatórias, que favorecem IL-8 na indução quimiotática de neutrófilos (RUBTSOV, RUDENSKY, 2007; SCHUBERTH et al., 2008; SAITO et al., 2010).

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que possui níveis plasmáticos elevados durante o final da gestação bovina e faz parte da rede regulatória do processamento do parto (KOETS et al., 1998). Durante o peri-parto observa-se resposta inflamatória de fase aguda que está relacionada ao dano tecidual que ocorre devido a atividade de contração do miométrio com seu subsequente relaxamento e dilatação do colo uterino e do canal do parto durante a expulsão do feto (KOETS et al., 1998).

A resposta imune produzida por esta citocina é do tipo 1 (Th1) e seus efeitos no processo de gestação estão relacionados a invasão do endométrio pela placenta (BAUER et al., 2004; CALLEJA-AGIUS et al., 2012), apoptose (BAUD e KARIN, 2001; DAVIES et al., 2004; HAIDER e KNOFLER, 2009; CALLEJA-AGIUS et al., 2012) e abortos (MONZON-BORDONABA et al., 2002; DAVIES et al., 2004; CALLEJA-AGIUS et al., 2012). A ação citotóxica de TNF- α é parcialmente mediada pelo aumento na geração de radicais livres dentro da mitocôndria associada à perda da função enzimática e a perturbação das cristas mitocondriais (SCHULZE-OSTHOF et al., 1992; CALLEJA-AGIUS et al., 2012). Não foram observadas diferenças na concentração das citocinas TNF- α , IL-10, TNF-R1 e TNF-R2 entre os vilos de fetos abortados e de fetos com desenvolvimento normais (CALLEJA-AGIUS et al., 2012).

TNF- α induz um aumento significativo da expressão de MHC de classe I no corpo lúteo (CL) promovendo a luteólise (SAKUMOTO et al., 2000). O CL é uma das fontes e o tecido alvo desta citocina em bovinos (TERRANOVA, 1997; SAKUMOTO et al., 2000). Quando a gestação inicialmente é estabelecida o CL produz progesterona (P_4) continuamente para a manutenção da mesma (SAKUMOTO et al., 2000; HAFEZ e HAFEZ, 2004). O aumento da concentração de receptores de TNF- α , bem como o aumento do mRNA desta citocina no CL bovino, ao final da gestação, contribui para a reabsorção luteal induzindo, desta forma, o parto nesta espécie (SAKUMOTO et al., 2000).

TNF- α possui ação citotóxica e estimula a secreção de prostaglandina E_2 (PGE_2) e prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) em células luteais, da espécie bovina, em meio de cultura (SAKUMOTO et al., 2000). Esta citocina também contribui, indiretamente, para a produção de P_4 através da estimulação de prostaglandina luteal no CL bovino durante o período de gestação (SAKUMOTO et al., 2000). Em um estudo (SAKUMOTO et al., 2000), verificou-se que a concentração de receptores de TNF- α no CL geralmente é significativamente menor no 2º trimestre da gestação bovina do que nos 1º e 3º trimestres. Este padrão de transição de TNF- α em vacas gestantes é semelhante à concentração de P_4 no CL bovino durante o período de gestação. Assim, a progesterona é um regulador da expressão de receptores de TNF- α no CL bovino e que a baixa concentração de receptores TNF- α no segundo trimestre de gestação no CL é devido ao decréscimo da concentração de P_4 neste período (SAKUMOTO et al., 2000).

Fator inibidor de leucemia (LIF) é uma citocina considerada essencial para a implantação do blastocisto e manutenção da gestação (LASS et al., 2001; ROBB, DIMITRIADIS, LI, 2002). Já o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o responsável pelo aumento do número e da permeabilidade dos vasos sanguíneos na interface endométrio-placenta (VONNAHME et al., 2001).

Marques Júnior (2006) observou maior expressão de VEGF e de seus receptores (Fit-1, KDR e Fit-4) na metade inicial da gestação (90 a 150 dias) de bovinos, seguida de um declínio próximo ao parto (210 a 270 dias). Segundo este autor a presença de proteína do VEGF ao longo da gestação indica sua importância no estabelecimento da função placentária, sendo que no início da gestação ela está relacionada ao desenvolvimento do leito vascular placentário e ao final com a manutenção deste leito.

O fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) é um fator de crescimento envolvido na regulação da proliferação de diversos tipos celulares (ROBERTS, ELLIS, 1999; LANG et al., 2001; KASHIWAKURA, TAKAHASHI, 2003). É também um importante

modulador da diferenciação (ROGELJ et al., 1989) e migração (BIKFALVI et al., 1995) celular, além de ser um potente indutor da angiogênese sob condições normais *in vitro* e *in vivo* (INGBER, FOLKMAN, 1989; LAZAROUS et al., 1995) e patológicas (HORI et al., 1991; YOSHIJI et al., 2002). Podem participar, ainda, da organogênese placentária (ZHENG et al., 1997) e da proliferação e da diferenciação das células placentárias (CATTINI et al., 1991; FERRIANI et al., 1994).

São poucos trabalhos realizados para detecção da expressão do MHC de classe I clássico e não clássico bovino referente à gestação natural e normal em bovinos, da mesma forma sobre como a função das citocinas e/ou sua expressão reguladora podem ser espécie específica (MURPHY et al., 2009). A maioria das pesquisas em bovinos é focada na parte patológica e/ou em infecções por bactérias, vírus e protozoários. O conhecimento sobre a fisiologia da resposta imunológica materna ao conceito é muito importante para o entendimento da gestação e para o uso de novas tecnologias reprodutivas, tais como clonagem, transferência de embrião e inseminação artificial, e no uso novas drogas. Com o aperfeiçoamento destas técnicas, poder-se-á ter um maior sucesso reprodutivo destes animais (MAURER, CHENALT, 1983). Portanto, a análise sobre a expressão do MHC e citocinas pró e antiinflamatórias, no reconhecimento fisiológico do aloenxerto fetal por parte materna, fornece informações a respeito da interação materno fetal durante a gestação, importantes para a eficiência reprodutiva do rebanho bovino.

Assim, o presente trabalho foi realizado mediante a quantificação da expressão de BoLA total, o qual contém os genes totais do BoLA clássico (BoLA-N*) e do BoLA não clássico (BoLA-NC*), do BoLA-N* e dos BoLA-NC* genes 2 e 4, bem como das citocinas TNF- α e TGF- β 1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (Protocolo CEUA 053/09) (Anexo I) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Bem como, todos os procedimentos, conduta no laboratório, manuseio dos materiais e amostras, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas em um manual da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006) e por Chaves-Borges e Mineo (1997).

4.2 Animais

Foram utilizados embriões na fase de blastocisto oriundos de fertilização *in vitro* (FIV), do Laboratório de Histologia da UFU, bem como, placentas de vacas abatidas em frigorífico (Frigorífico Luciana, Uberlândia, MG, Brasil) com diversos tempos gestacionais.

As amostras foram divididas em sete grupos (1 ao 7):

Grupo 1: Útero não gestante

Grupo 2: Blastocisto expandido e/ou eclodido (coletados no dia 8 pós FIV)

Grupo 3: carúnculas ou cotilédones com até 1 mês de gestação

Grupo 4: carúnculas ou cotilédones com 2 a 3 meses de gestação

Grupo 5: carúnculas ou cotilédones com 4 a 5 meses de gestação

Grupo 6: carúnculas ou cotilédones com 6 a 7 meses de gestação

Grupo 7: carúnculas ou cotilédones com 8 a 9 meses de gestação

Obtiveram-se cinco amostras de tecido por grupo, sendo que, do grupo 3 ao 7, foram coletadas dos tecidos placentário fetal (cotilédone) e materno (carúncula) separadamente para realização da PCR em tempo real ou do placentoma para processamento de imunofluorescência.

Quanto aos blastocistos foram utilizados cinco pools contendo 10 blastocistos cada para processamento da PCR em tempo real e 20 blastocistos, bem como, cinco ovócitos para processamento de imunofluorescência.

4.3 Determinação da Idade Gestacional

A idade dos embriões e fetos (Tabela 1) foi estimada baseando-se na seguinte fórmula: $DG = 8,4 + 0,087C + 5,46 \sqrt{C}$, onde: DG = dias de gestação e C = comprimento do embrião ou feto (REXROAD et al., 1974). Após sua retirada do útero, o comprimento do embrião foi mensurado em milímetros (mm), desde a curvatura do vértice cefálico ao coccígeo (comprimento crânio-caudal ou *crown-rump*), sendo sempre realizado pela mesma pessoa (DINIZ et al., 2005).

4.4 Remoção dos Placentômas

Após inversão do útero, os placentomas foram removidos e fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 ou em formol 10% tamponado, sendo o volume dez vezes superior ao tamanho dos tecidos removidos.

Fatias com mais ou menos 1cm de placentoma foram colocadas em criomolde de 15x15x5mm (TED PELLA), preenchidos com meio de inclusão para espécimes em congelação (Jung Tissue Freezing Medium, Leica), congelados em nitrogênio líquido (N₂L) e armazenados em freezer com temperatura igual a 20°C negativos, para realização de imunofluorescência e coloração histomorfológica com eosina e hematoxilina (HE).

Processou-se a separação mecânica das carúnculas e cotilédones nos placentomas e fatias de mais ou menos 1cm foram acondicionados em criotubos de 2mL, autoclavados e livres de DNase e RNase, contendo 1mL de solução estabilizadora de RNA (RNAlater® Tissue Collection, Applied Biosystems), congelados em N₂L e armazenados em ultrafreezer com temperatura igual a 80°C negativos, para posterior extração de ácido ribonucléico (RNA).

Tabela 1 Idade gestacional estimada de fetos e embriões bovinos, segundo a fórmula de Rexroad et al. (1974).

Animal	Crown-rump (mm)	DG	PG (Grupo)	Sexo
04	60	55,91	até 1 mês (3)	Não identificado
40	5	21,04		Não identificado
41	7	23,45		Não identificado
52	35	43,75		Não identificado
53	25	35,7		Não identificado
10	260	119,06	2 a 3 meses (4)	Macho
18	130	81,96		Macho
19	190	100,19		Macho
32	90	68,03		Fêmea
47	110	66,83		Fêmea
11	330	136,30	4 a 5 meses (5)	Fêmea
37	400	152,4		Macho
44	420	156,84		Macho
45	360	143,32		Macho
46	380	147,89		Fêmea
08	630	200,25	6 a 7 meses (6)	Fêmea
13	580	190,35		Fêmea
16	780	228,75		Macho
34	795	231,51		Macho
38	610	196,32		Macho
09	880	246,93	8 a 9 meses (7)	Macho
14	900	250,50		Macho
15	880	246,93		Fêmea
42	930	255,82		Macho
60	850	241,53		Macho
02	-	-	Útero não gestante (1)	-
21	-	-		-
23	-	-		-
25	-	-		-
28	-	-		-

Nota: mm = milímetros; DG = dias de gestação; PG=período gestacional.

4.5 Fertilização *in vitro*

Os ovários foram coletados em frigorífico (Frigorífico Real, Uberlândia, Minas Gerais) durante o processo de abate. Os mesmos foram colocados em uma garrafa térmica contendo tampão fosfato-salino (PBS 1x) (Anexo II, item 1.3) em temperatura de 38°C e quantidade suficiente para cobrir todos os ovários, para realização de seu transporte até o Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da UFU.

Com o uso de uma seringa descartável de 10mL e agulha 40x1,2 (21G) puncionou-se os ovários para aspiração de folículos antrais. O líquido folicular aspirado foi colocado em tubos falcon de 50mL em banho-maria a temperatura de 38°C, onde aguardou-se, durante cinco minutos, sua sedimentação para posterior rastreamento e classificação dos ovócitos acondicionados em placa de petri 100x20 e visualizados em microscópio estereoscópio (15x). Foram separados somente complexos de cúmulos ovócito (CCO) de melhor qualidade, ou seja, que apresentassem núcleo e ooplasma homogêneo com mais de três camadas de células do cúmulos. Os ovócitos foram lavados em duas gotas contendo 150 microlitros (µL) de TCM-199 Bicarbonato (Anexo II, item 1.6) aquecido em banho-maria a temperatura de 38°C. O processo de maturação dos ovócitos foi realizado com a adição de 25 ovócitos em 150µL de Meio de Maturação (Anexo II, item 1.7) durante 22 a 24 horas em estufa de CO₂ (5% CO₂, 39°C e umidade saturada).

Para realização da fertilização *in vitro* (FIV) osêmen, previamente estocado, foi descongelado e os espermatozóides foram selecionados por centrifugação em um tubo falcon de 15mL contendo gradiente de concentração composto por 2.000µL de Percoll 45% e 2.000µL de Percoll 90% (Anexo II, item 1.9), a 700g durante 20 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Foram então adicionados 2.000µL de Meio Talp-Sperm (TALP = *Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate Media*) (Anexo II, item 1,8) ao sedimento restante. Após homogenização nova centrifugação foi realizada a 700g, durante cinco minutos, com posterior descarte do sobrenadante. Adicionou-se, então, 150µL de Meio Talp-Fert (Anexo II, item 1.8) e realizou-se a avaliação da motilidade (estimativa visual) e concentração espermática (contagem em câmara de Neubauer). Um total de 10⁶ espermatozoides e aproximadamente 25 ovócitos foram adicionados a gota de fertilização, na placa de petri 35x10, contendo 120µL de Meio Talp-Fert acrescida de 20 µL de Solução de Heparina (Anexo II, item 1.11.2). O período de fecundação teve duração entre 18 e 20 horas, em estufa de CO₂, e foi considerado como dia zero (D0)

O desnudamento dos zigotos foi realizado em gota contendo 100µL de meio SOF (*Syntethic Oviductal Fluid*) (Anexo II, item 1.12) por meio de pipetagem. Os zigotos foram lavados em 80µL de Meio SOF e cultivados em outra gota com 150µL de Meio SOF. Avaliaram-se as clivagens no dia dois (D2), a formação de blastocisto no dia sete (D7) e a taxa de eclosão no dia nove (D9). Foi realizada a troca do meio de cultivo nos dias quatro e seis. Um *pool* contendo 10 blastocistos foi coletado e congelado em nitrogênio líquido (N₂l)

no dia 8 (D8) para extração de RNA e blastocistos entre os dias sete e nove foram coletados para avaliação imunohistoquímica do MHC de classe I.

4.6 Microscopia Confocal

Cinco amostras de placentoma de cada período gestacional foi coletada, excetuando-se o grupo três, com período gestacional igual até um mês, onde o cotilédone foi coletado separadamente da carúncula, devido ao processo de implantação do embrião, que em bovinos se inicia tardiamente (aproximadamente 17º dia de gestação).

As amostras incluídas em meio de inclusão para espécimes em congelamento (Jung Tissue Freezing Medium, Leica) foram cortadas, seriadamente, com espessura igual a 10 micrometros (μm) em criostato (Leica CM1850 UV) com temperatura igual a menos 20°C. Colocaram-se dois cortes em cada lâmina previamente silanizada a 2% (Organosilano). Foram obtidas duas lâminas de cada amostra, sendo que uma delas para a realização de imunofluorescência e outra para coloração histomorfológica.

A reação de imunofluorescência foi realizada com fixação dos tecidos durante 10 minutos, sob refrigeração (4°C), em acetona pura gelada. Três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS 1x), com duração de 5 minutos cada, foram realizadas para retirar o excesso do fixador. Uma permeabilização com triton X-100 0,5%, assim como, a reativação antigênica com citrato de sódio 0,1% foram realizados conjuntamente durante uma hora em temperatura ambiente. Três lavagens com PBS 1x e duração de 5 minutos cada, foram realizadas para retirar o excesso desta solução. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com uma solução aquosa com 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) diluído em PBS 1x, durante 15 minutos em temperatura ambiente (BENEVIDES et al., 2008). As lâminas foram imersas três vezes em PBS 1x, com duração de 5 minutos cada imersão, para retirar o excesso desta solução aquosa.

As amostras foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-MHC classe I de ovelha (Santa Cruz Biotechnology Inc.), durante quatro horas sob refrigeração (4°C), dentro de uma caixa escura e fechada, para evitar o ressecamento dos cortes. Para retirada do excesso do anticorpo primário, foram realizadas cinco lavagens seriadas com PBS 1x e duração de 5 minutos cada lavagem.

Utilizou-se como anticorpo secundário o anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma-Aldrich Inc.), com o qual os cortes das amostras ficaram

incubados por 45 minutos em câmara escura. Cinco lavagens, com PBS 1x por 5 minutos cada, foram realizadas para remoção do excesso do anticorpo secundário.

Para marcação dos núcleos celulares incubou-se as amostras com iodeto de propídio, diluído 1/200 em PBS 1x, durante 20 minutos. Procedeu-se, então, um total de três lavagens com PBS 1x para retirada do excesso deste fluorocromo nuclear. As lâminas foram montadas com a adição de uma gota, por corte, de glicerina 90%, diluída em PBS 1x, cobertas com lamínulas limpas e vedadas lateralmente com esmalte de cor escura para evitar o ressecamento das mesmas. O material foi armazenado em caixa escura e opaca própria para lâminas sob refrigeração (4°C).

Este material foi observado em microscópio confocal (Zeiss LSM 510 META), com comprimento de excitação de 488nm e com pico de emissão de 525nm. A reação foi acompanhada de controles negativos, nos quais a incubação com o anticorpo primário foi omitida, e de controle positivo, utilizando-se amostra de linfonodo como material positivo, para verificação da eficácia da marcação dos anticorpos.

Os blastocistos foram submetidos ao mesmo processo descrito acima com as modificações que seguem: processamento em pequenas placas de Petri (35x10) de plástico, sem congelamento prévio, *in natura*, e a transferência dos blastocistos entre as soluções era realizada com o auxílio de micropipeta e lupa. As lavagens entre as trocas de anticorpos também foram reduzidas, com o intuito de danificar o menos possível os espécimes a serem analisados, haja vista que os blastocistos são mais sensíveis do que os cortes de placentomas.

Para a análise morfológica, os cortes congelados foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para observação em microscópio óptico (Zeiss) e captura em microscópio de captura (Leica DM500; câmera fotográfica Leica ICC50).

4.7 Extração de RNA e síntese de cDNA

Foram utilizados 100mg de tecido de linfonodo, baço, carúncula, cotilédone e útero bovino, durante o intervalo gestacional (blastocisto até 9 meses de gestação), para purificar o RNA total utilizando Trizol Reagent® (Invitrogen) seguindo-se as recomendações do fabricante.

Cada tecido foi cortado, individualmente, em pequenos pedaços e colocado em um tubo de 2mL, devidamente nomeados, contendo 1mL de trizol para serem homogeneizados. Os tecidos homogeneizados ficaram imersos no trizol durante 10 minutos, em temperatura ambiente, quando, então, foram centrifugados a 12.000g, durante 10 minutos em temperatura

refrigerada (4°C). O sobrenadante foi colocado em um microtubo novo de 2mL, devidamente nomeado, e procedeu-se a adição de 200µL de clorofórmio com posterior homogeneização manual durante 15 segundos, deixando-o descansar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se a centrifugação do tubo a 12.000g, refrigerado (4°C) durante 15 minutos. Observou-se a formação de três fases no microtubo, de onde se retirou, com o auxílio de um micropipetador de 1.000µL, aproximadamente 500µL da fase mais superficial (fase aquosa), pois era o local onde se encontrava o RNA. Esta fase aquosa foi depositada em um microtubo novo de 1,5mL, devidamente nomeado e datado, contendo 500µL de álcool isopropílico. A amostra foi homogeneizada e incubada, a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Centrifugou-se o material, sob refrigeração, a 12.000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 1 mL de etanol 75%. Centrifugou-se a amostra, sob refrigeração, a 7.500g durante 5 minutos. Mais uma vez, descartou-se o sobrenadante e o péletti contido no sedimento foi secado, em temperatura ambiente, durante 10 minutos. Procedeu-se a diluição do péletti com 50µL de água DEPC (Invitrogen). A amostra de RNA foi armazenada em ultrafreezer (-80°C).

As amostras foram digeridas com DNase (RQ1 DNase, Promega) a 37°C durante 40 minutos, desnaturadas a 72°C durante 10 minutos, estabilizadas a 4°C durante 5 minutos e quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-100 Spectrophotometer). Após a quantificação, as amostras de RNA foram diluídas, com água DEPC, para ficarem concentradas em 200ng/µL e armazenadas em ultra-freezer a menos 80°C. A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% e por leituras espectrofotométricas com absorbância entre 260 e 280nm. Foram utilizadas apenas as amostra que tiveram leituras espectrofotométricas superiores a 1,65.

Na reação de transcrição foi utilizado 1µg de RNA total misturado a 500µM de dNTP e 100 pmol de Oligo Pdn6 (oligos aleatórios curtos, Invitrogen), tampão 1X, 5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 10µM de DTT (Invitrogen), 1U de RNase Out (Invitrogen) e 200U de MMLV-RT (Invitrogen), completando-se o volume com água DEPC para 20µl. A reação foi incubada por 37°C durante 1 hora. A qualidade do cDNA foi avaliada pela amplificação de um fragmento de 82 pares de base (pb) do gene de referência GAPDH (desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato). Observar exemplo de validação do cDNA na Figura 1.

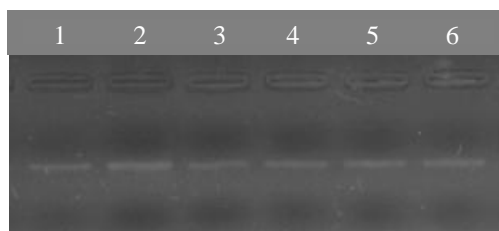


Figura 1 Exemplo de validação do cDNA com o gene controle de referência (GAPDH) em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Amostras 1 e 6 = 6 a 7 meses; 2, 3, 4 e 5 = 8 a 9 meses de gestação; 1, 3 = carúnculas; 2, 4 e 6 = cotilédones.

4.8 Quantificação relativa de transcritos de MHC-I mRNA por PCR Tempo Real (qPCR)

Os *primers* para os genes do MHC-I clássico (BoLA-N*) e não clássico (BoLA-NC) gene 2 (NC-2) de bovinos (*Bos taurus*) foram os mesmos usados por Davies et al. (2006) e Birch et al. (2008) respectivamente. Enquanto que os *primers* bovinos para o gene 4 não clássico do MHC de classe I (NC-4, Gene Bank: BoLA-NC4* 50401), gene de referência GAPDH (desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato), TGF- β 1 (fator de crescimento tumoral beta 1) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) foram desenhados usando *Primer Express software* (Applied Biosystem) (Tabela 2).

As reações de RT-PCR Tempo Real foram realizadas em placas de leitura ópticas de 96-poços, em duplicata. Cada reação conteve 1X POWER SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 5,0pmol de cada *primer*, 2 μ L cDNA em um volume final de 10 μ L (completado com água MiliQ autoclavada).

Inicialmente os oligonucleotídeos foram padronizados em amostras de tecido de linfonodo e baço, que contêm grandes quantidades de linfócitos e conseqüentemente de transcritos de MHC classe I. Depois as amostras foram testadas na PCR convencional com o gene endógeno GAPDH bovino para a confirmação do fragmento amplificado e da ausência de *amplicons* inespecíficos. As reações de PCR convencional para a amplificação destes oligonucleotídeos foram realizadas para um volume final de 20 μ L contendo: 4 μ L de cDNA, 1U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH 8.3, 1,5mM MgCl₂ (Invitrogen), 200M dNTPs (Invitrogen) e 5.0pmol de *primers* direto (*forward*) e reverso (*reverse*). As condições das reações foram: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 59°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2 Primers utilizados na tese de doutorado intitulada “Antígeno Leucocitário Bovino (BoLA) de classe I e perfil do TNF- α e TGF- β na placenta durante a gestação”.

Gene		Primer Desenhado	Fragmento (pb)	OBS
GAPDH	F	GAAGGTCGGAGTGAACGGATT	82	F entre exons 2 e 3
	R	CGACGATGTCCACTTTGCC		
NC-1	F	GGTCCCCCGAGACAGAC		Birch et al. (2008)
	R	TCAGGGCGAGGTAATCTT		
NC-2	F	CATCAGGAGACGCAGAGAACT		Birch et al. (2008)
	R	AGCATTGTGCTTGGTGACT		
NC-3	F	GGCTCCCCTCCCTGAGC		Birch et al. (2008)
	R	TCTGCCGTCGTAGGCCTT		
NC-4	F	CCTCTCCCTGAGATGGAAACC	121	F entre exons 4 e 5 e R entre 5 e 6
	R	GCTTCTTCCTCCAAATCACAGC		
MHC-I	F	TTGTGGAGACCAGGCCTTCAG		Davies et al (2006)
	R1	GAGAACCAGGCCAACAATGATG		
	R2	AGGAGAACCAGGACAAGAATGATG		
	R3	AATGATGCCCATGGTGAGGAA		
TNF- α	F	AGCCACGTTGTAGCCGA	132	F entre exons 3 e 4
	R	GAGGTAAAGCCCGTCAGCAG		
TGF- β 1	F	GCTAATGGTGGGAATACGGCAA	130	
	R	CGTCTGCCCCGAGAGAGCA		

Nota: F= forward, R = reverse. OBS: observação (posição entre exons desenhados ou autor de onde se adquiriu os primers)

Utilizou-se a eletroforese em gel de agarose 1,5%, 120 volts durante 30 minutos, para visualização dos *amplicons*, utilizando-se como tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5X, corado com 1,5 μ L de brometo de etídio, visualizado por luz UV (ultra-violeta) em um transluminador (L.PIX Locus biotecnologia).

As reações de qPCR foram feitas no aparelho ABI 7300 Sequencer Detector (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 61°C por 2 minutos para o par de *primers* BoLA-NC2, e com as mesmas condições, alterando-se a última temperatura para 59°C para os pares de *primers* BoLA-N* R3 e TGF- β 1, 58°C para os pares de *primers* BoLA-N* R1 e R2 e 57°C para os pares de *primers* BoLA-NC-4 e TNF- α .

O C_T (*Cycle Threshold*) foi definido como o primeiro ciclo no qual ocorreu um aumento significativo na magnitude do sinal gerado, detectado na reação de PCR. Os valores do C_T foram calculados pelo *real-time sequencer detection software* (Applied Biosystems) e foram usados para calcular a expressão de todos os mRNA dos genes estudados nesta tese relativos ao mRNA do gene normalizador GAPDH. Os níveis de expressão foram calculados relativos ao útero não gestante para as amostras de carúnculas de todos os genes estudados, com exceção do gene BoLA-NC2, o qual foi calculado relativo as carúnculas com até um mês

de gestação, em virtude da ausência deste gene no útero não gestante, e relativos aos cotilédones com até um mês de gestação para os cotilédones de todos os genes estudados neste trabalho, usando o de ddCt ($2^{-\Delta\Delta CT}$) para os cálculos do *fold change* (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; STEPHENSON, 2010).

4.9 Qualificação de transcritos de BoLA de classe I por PCR

Os *primers* para os genes do MHC-I não clássico (BoLA-NC-1 e 3) de bovinos (*Bos Taurus*) foram os mesmos usados por Birch et al. (2008) (Tabela 2). Já o *primer* do gene GAPDH bovino, que foi usado como gene de referência, foi desenhado usando *Primer Express software* (Applied Biosystem) (tabela 2).

Utilizou-se a eletroforese em gel de agarose 1,5%, 120 volts durante 1 hora, para visualização dos *amplicons*, utilizando-se como tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1mM EDTA) 0,5X, corado com 1,5µL de brometo de etídio, visualizado por luz UV em um transiluminador (L.PIX Loccus biotecnologia), onde visualizou-se a presença ou ausência de transcritos. Foram utilizadas 3 amostras de mRNA de cada tecido (útero, carúncula e cotilédone).

4.10 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism (versão 5.0). Utilizou-se a análise de colunas para verificação da normalização dos dados. Aplicou-se o One Way Anova utilizando o teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Imunofluorescência

Para confirmação dos resultados encontrados na qPCR do BoLA total (clássico e não-clássico) foram analisados placentomas (cotilédone e carúncula) em ensaio de imunofluorescência e visualização em microscópio confocal. Optou-se por usar um anticorpo MHC classe I monoclonal de camundongo produzido contra timócitos de origem de cabra devido a sua reação cruzada com bovinos e a grande dificuldade no encontro de MHC de classe I especificamente bovino. Como anticorpo secundário optou-se por usar um coelho anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que gera imunofluorescência em verde. Para facilitar a diferenciação das marcações escolheu-se usar iodeto de propídio, o qual cora os núcleos. Como a imunofluorescência não mostra o tecido em detalhes, preferiu-se colocar uma figura de coloração com HE para facilitar o entendimento das células das Figuras 3 e 4.

O anticorpo monoclonal se liga a apenas um epítipo, diferentemente do policlonal que se liga a vários epítipos, com isso há um aumento na especificidade e o anticorpo pode não se ligar em todos os BoLA devido ao alto polimorfismo encontrado nestas moléculas. Por outro lado sabe-se que o complexo de histocompatibilidade principal está ali, mas não se sabe se as proteínas produzidas pelo feto e ou útero tenham compatibilidade de ligação com estas moléculas para causar a rejeição.

A zona pelúcida do ovócito não fecundado foi marcada pelo anticorpo MHC de classe I ovino (Figura 2A). Esta marcação persistiu na zona pelúcida do blastocisto expandido (Figura 2B). Já no blastócito eclodido, onde a zona pelúcida está ausente, verificou-se a marcação das células do trofoblasto (Figura 2C).

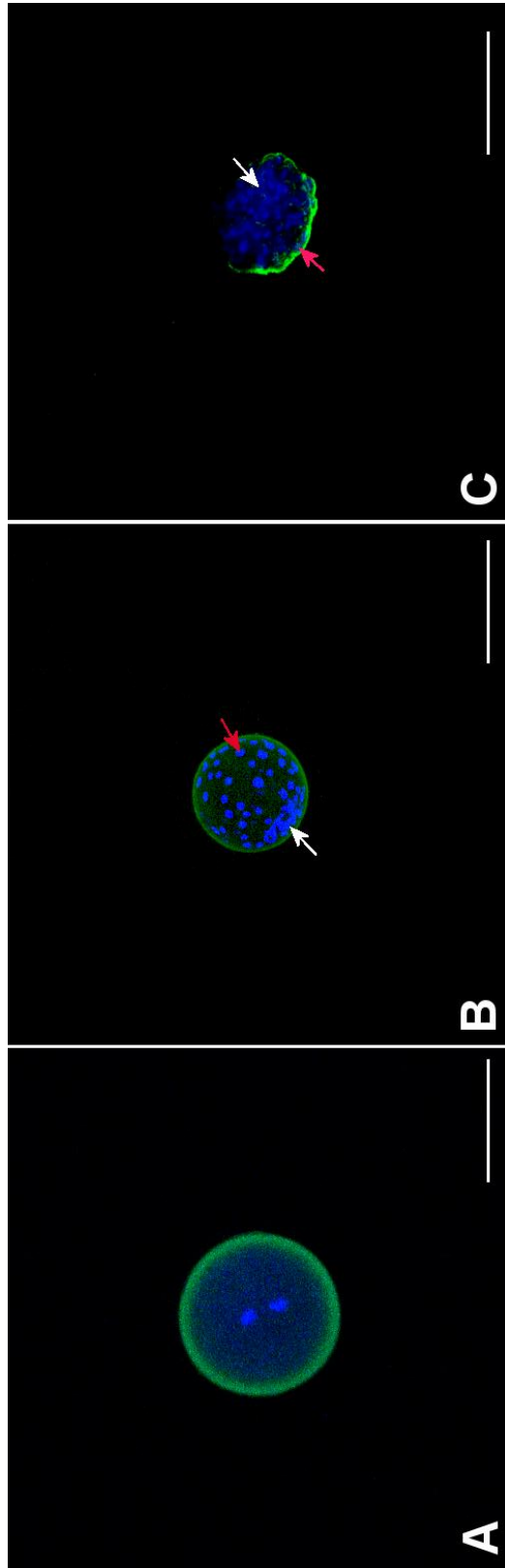


Figura 2: A. Ovócito marcado com anticorpo MHC-I – FITC (verde). Observar a marcação em verde da zona pelúcida e dos cromossomos em anáfase I da meiose em azul. B. Blastocisto expandido marcado com anticorpo MHC-I – FITC (verde). Visualizar a zona pelúcida marcada em verde, o núcleo (azul) das células da massa celular interna (ICM) apontados pela seta branca. A seta vermelha aponta os núcleos (azul) das células do trofoblasto. C. Blastocisto eclodido marcado com anticorpo MHC-I – FITC (verde). Notar as células do trofoblasto marcadas em verde, o núcleo (azul) das células da massa celular interna (ICM) apontados pela seta branca. A seta vermelha aponta os núcleos (azul) das células do trofoblasto. Barra = 100µm.

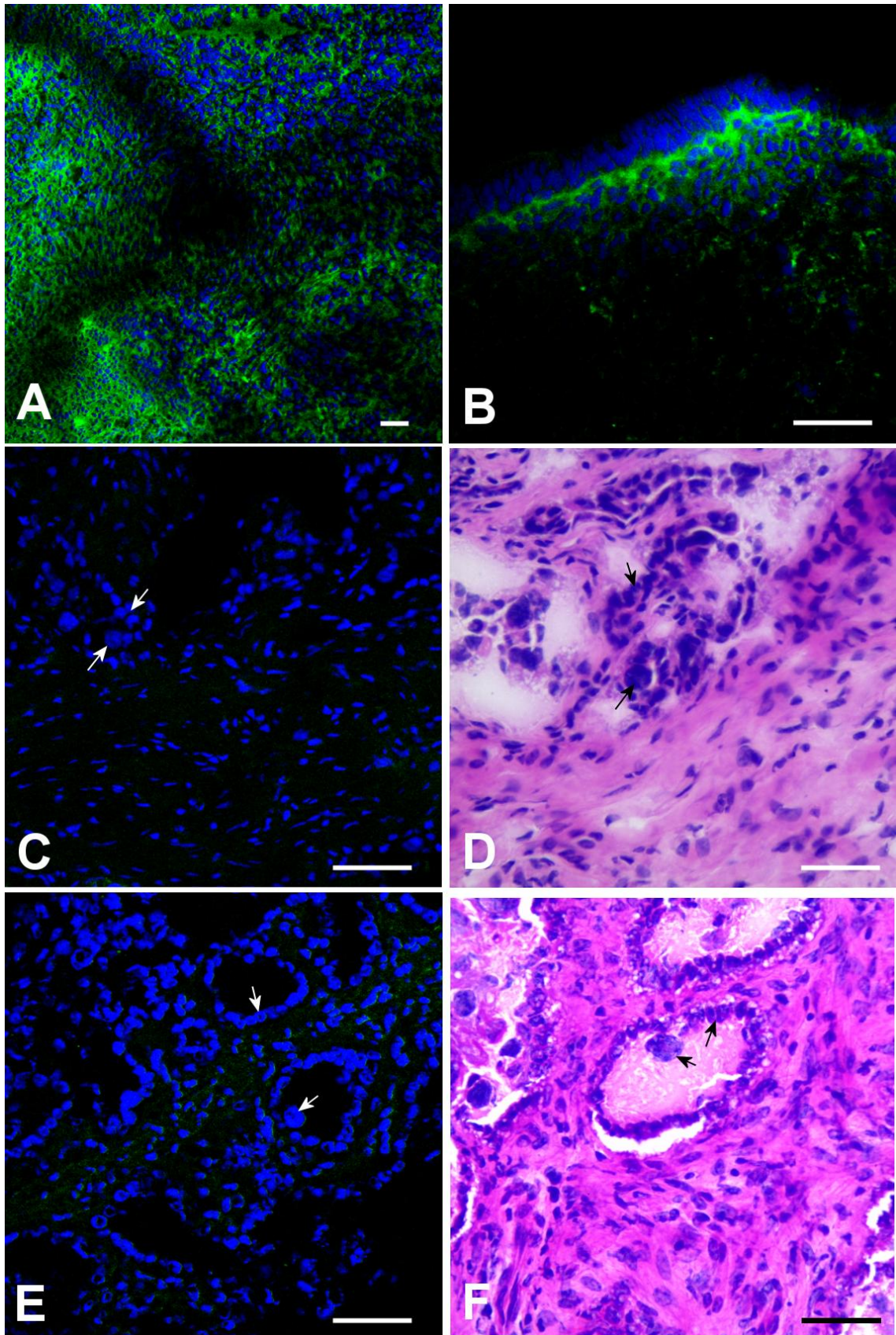


Figura 3: A. Baço marcado com anticorpo MHC-I – FITC (verde). Observar a intensa marcação em verde e os núcleos em azul. B. Útero vazio marcado com anticorpo MHC-I – FITC. Observar a lâmina própria bem marcada em verde e os núcleos em azul. C. Cotilédone com 21 dias de gestação marcado com anticorpo MHC-I – FITC com marcação fraca. D. Cotilédone com 21 dias de gestação corado com HE. E. Cotilédone com 2 a 3 meses de gestação marcado com anticorpo MHC-I – FITC com marcação fraca. F Cotilédone com 2 a 3 meses de gestação corado com HE. Setas indicam trofoblasto. Barra = 100µm.

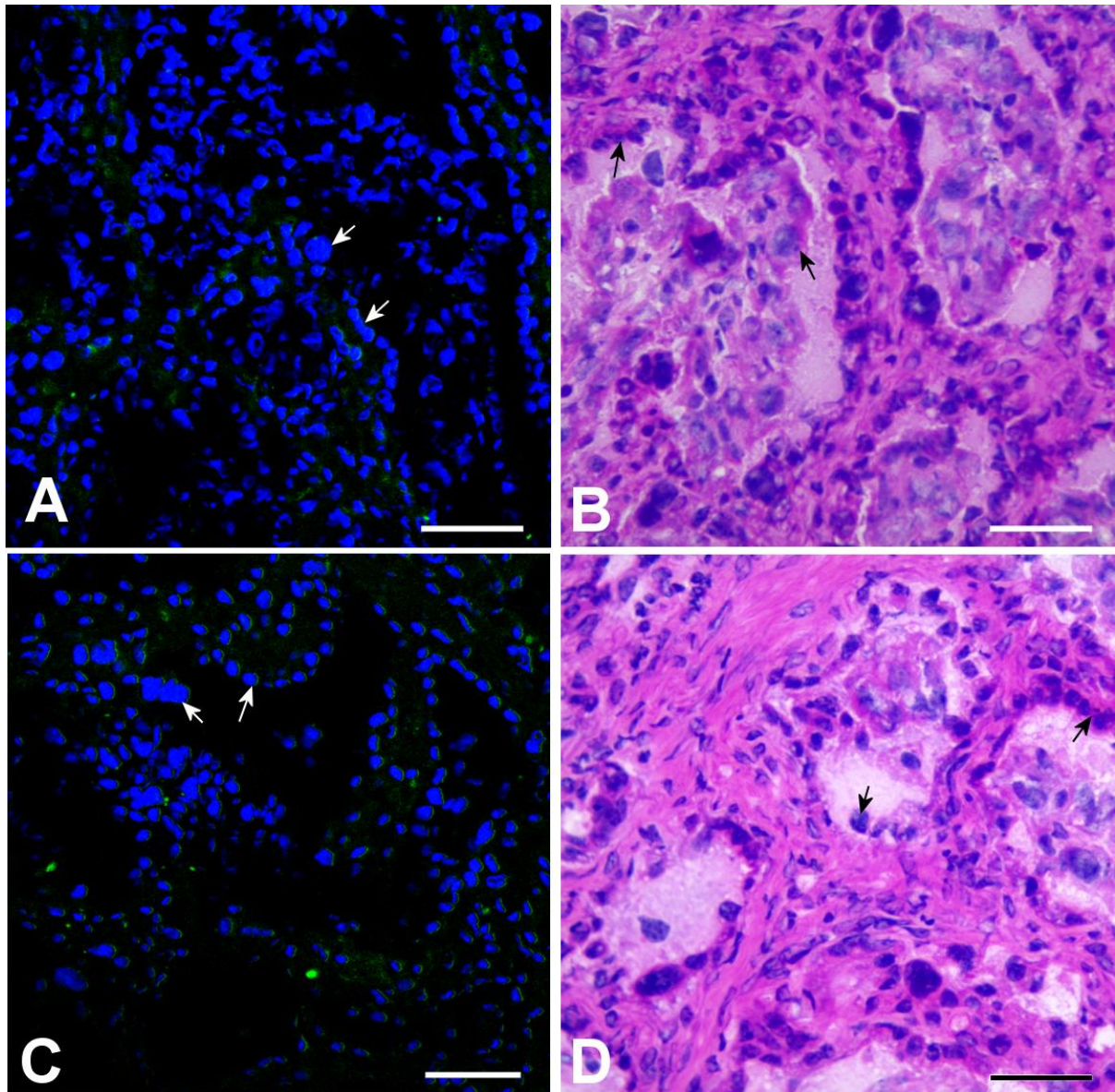


Figura 4: A. Placentoma com 6 a 7 meses de gestação marcado com anticorpo MHC-I – FITC apresentando marcação fraca (verde) e os núcleos em azul. B. Placentoma com 6 a 7 meses de gestação corados com HE. C. Placentoma com 8 a 9 meses de marcado com anticorpo MHC-I – FITC com marcação fraca (verde) e os núcleos em azul. D. . Placentoma com 8 a 9 meses corado com HE. Setas indicam trofoblasto. Barra = 100µm.

Pela visualização das Figuras 3 e 4 percebe-se marcação bem acentuada do anticorpo BoLA nas células de baço, que serviu como controle positivo para a quantificação de BoLA na qPCR. Analisando-se as figuras subsequentes, referentes ao tecido uterino e aos cotilédones em vários PG, observou-se fraca ou ausência de marcação, semelhantes à observação referente à qPCR do BoLA.

5.2 Análise Molecular

Para análise molecular escolheu-se a média da quantidade de cada transcripto encontrada no endométrio dos úteros não gestantes como calibrador da qPCR para os tecidos

dos úteros gestantes. Excetuou-se desta escolha o gene não clássico 2 (BoLA-NC2), em virtude da ausência deste gene em úteros não gestantes. Assim, escolheu-se como calibrador a média das carúnculas com até um mês de gestação.

No caso dos cotilédones escolheu-se como calibrador a média dos *pools* de blastocistos devido a seu efeito temporal. Primeiro forma-se o blastocisto para depois ocorrer a formação e desenvolvimento dos cotilédones. Para o gene não clássico 4 (BoLA-NC4) utilizou-se a média dos cotilédones com até um mês de gestação, pois os blastocistos não apresentaram expressão com o gene alvo (BoLA-NC4) nas placas analisadas pela qPCR.

Os valores dos gráficos ddCt foram analisados tendo por base o princípio de que o Ct (*Cycle Threshold*) é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene alvo (BoLA, BoLA-N*, BoLA-NC2 e 4, TNF- α e TGF- β) em uma determinada amostra e normalizado com o valor do Ct dos genes controle de referência (GAPDH) nestas mesmas amostras. Assim, quanto menor for o número inicial do Ct maior será a amplificação do gene alvo; enquanto que, para se obter a quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes em estudo (*fold change*), os cotilédones e as carúnculas nos períodos gestacionais (PG) analisados e o útero não gestante foram comparados a média do dCt dos blastocistos ou dos úteros não gestante pela metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001) e Stephenson (2010). Deste modo procedeu-se análise dos gráficos da RT-PCR em tempo real (qPCR).

5.2.1 Quantificação de Transcritos de BoLA total por qPCR

Utilizou-se um *forward* e dois reversos (R1 e R2) para a amplificação de transcritos de todos os alelos de BoLA total, tanto os clássicos quanto os não clássicos (DAVIES et al., 2006). Houve diferença entre o útero não gestante e a carúncula com um mês de gestação aos transcritos de BoLA reverso 1 (R1), onde verificou-se que o útero apresentou uma menor quantidade de BoLA total do que a carúncula com um mês de gestação (Figura 5A). Não existiu diferença estatística entre os PG das carúnculas com os transcritos de BoLA total reverso 2 (Figura 5B).

Os blastocistos apresentaram uma quantidade maior de transcritos BoLA R1 do que os cotilédones com PG iguais a “1”, “2 e 3” e “8 e 9” meses (Figura 5C). Não houve diferença estatística entre os períodos gestacionais estudados dos cotilédones com BoLA R2 (Figura 5D).

Comparando-se os valores do *fold change* da parte materna (*fold change* 50 a 350) da placenta com a parte fetal (*fold change* 2 a 25), percebe-se que o tecido materno produz muito mais BoLA total (Figura 5).

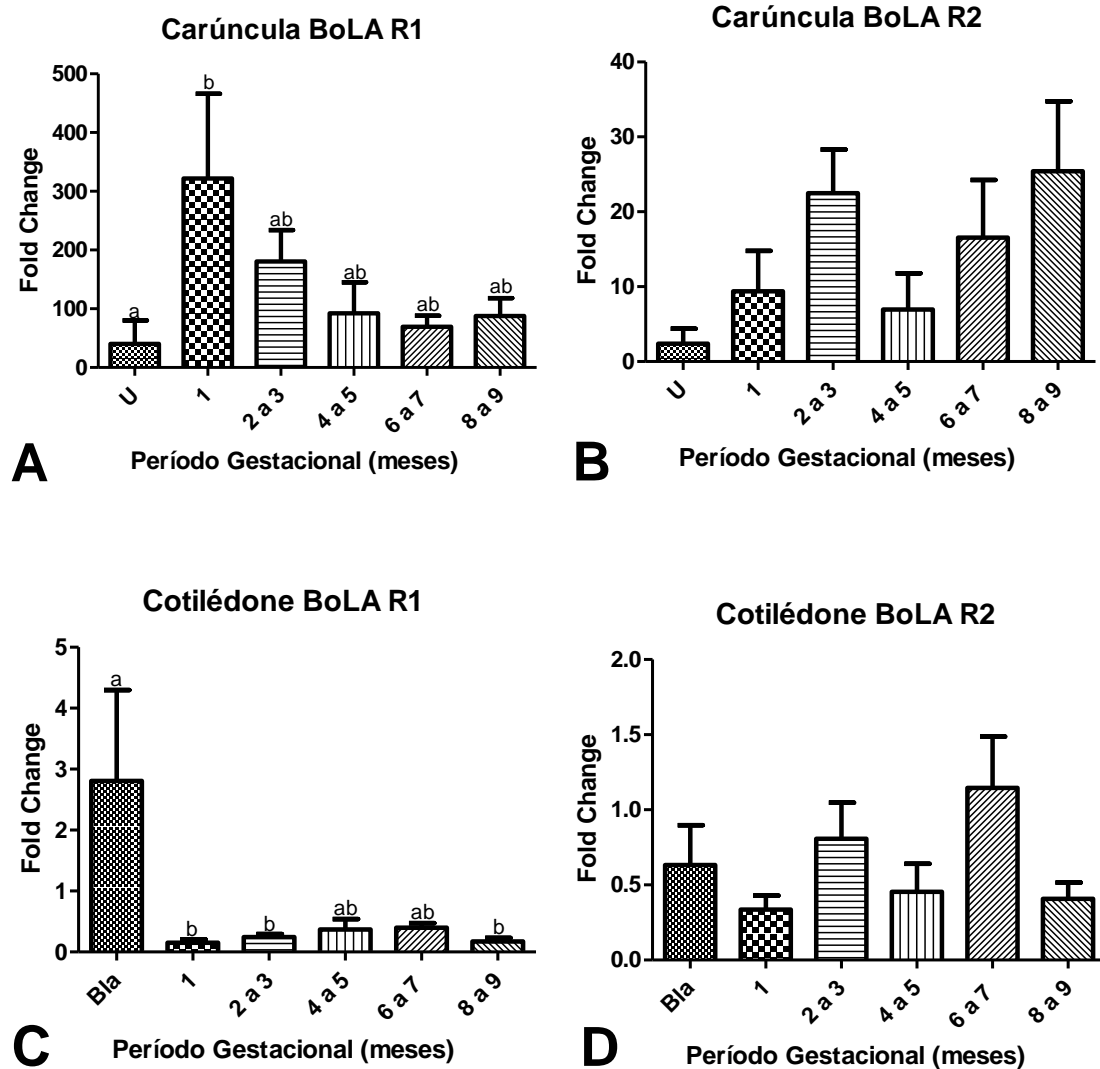


Figura 5: Quantificação relativa de transcritos de BoLA cujos primers amplificam todos os alelos clássico e não clássico em carúncula (A e B) e cotilédone (C e D) bovinos durante todos os períodos gestacionais (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). A média dos úteros vazios foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. U = útero não gestante. Bla = blastocisto.

5.2.2 Quantificação de Transcritos de BoLA clássico (BoLA-N*) por qPCR

Utilizou-se um par de primers capaz de quantificar todos os loci de BoLA clássico, BoLA R3 (DAVIES et al., 2006). Na parte materna da placenta bovina verificou-se que o último bimestre de gestação (PG “8 a 9” meses) teve mais transcritos BoLA clássico do que os demais PG e o útero não gestante (Figura 6A). Já na parte fetal da placenta observou-se uma maior quantidade de transcritos BoLA-N* nos blastocistos do que nos cotilédones

durante os demais PG (Figura 6B). De um modo geral, os níveis transcricionais de BoLA clássico foram muito baixos nos blastocistos e cotilédones (Figura 6B). Estes quando comparados as carúnculas e útero não gestante obtiveram os menores níveis transcricionais (Figuras 6A e B).

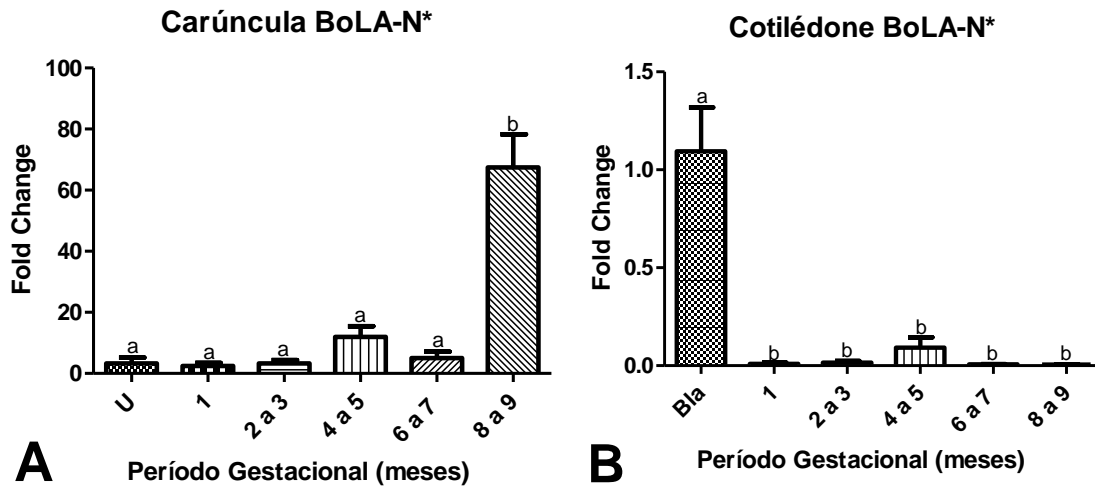


Figura 6: Quantificação relativa de transcritos de BoLA clássico em carúncula (A) (Bonferroni, $p < 0,05$) e cotilédone (B) (Teste Bonferroni, $P < 0,05$) bovinos durante todos os períodos gestacionais. A média dos úteros vazios foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). BoLA-N* = MHC classe I clássico bovino, U = útero não gestante. Bla = blastocisto.

5.2.3 Quantificação de Transcritos de BoLA Não-Clássico (BoLA-NC*) por qPCR

Como o BoLA Total e o Clássico (BoLA-N*) eram conhecidos extrapolaram-se os dados para o cálculo do BoLA não clássico (BoLA-NC*), contendo todos os genes (1, 2, 3 e 4), onde somou-se o *fold change* dos reversos (R1 e R2) do primer BoLA total e dele subtraiu-se o *fold change* do primer BoLA Clássico (R3).

A quantidade de transcritos de BoLA-NC* foi maior do que a de BoLA-N* presente nas carúnculas (figuras 5A e 6A, respectivamente). Verificou-se uma maior quantidade de transcritos na parte materna da placenta com um mês de gestação quando comparada ao útero não gestante (Figura 7A). Nos demais PG não houve diferenças significativas, entre as carúnculas analisadas (Figura 7A).

Na parte fetal da placenta bovina notou-se que os blastocistos tiveram menor quantidade de transcritos BoLA-NC* do que os cotilédones com “2 a 3” e “6 a 7” meses de gestação (Figura 7B). Enquanto que o PG de “6 a 7” meses apresentou maior quantidade de transcritos BoLA-NC* do que os PG de “até 1”, “4 a 5” e “8 a 9” meses (Figura 7B).

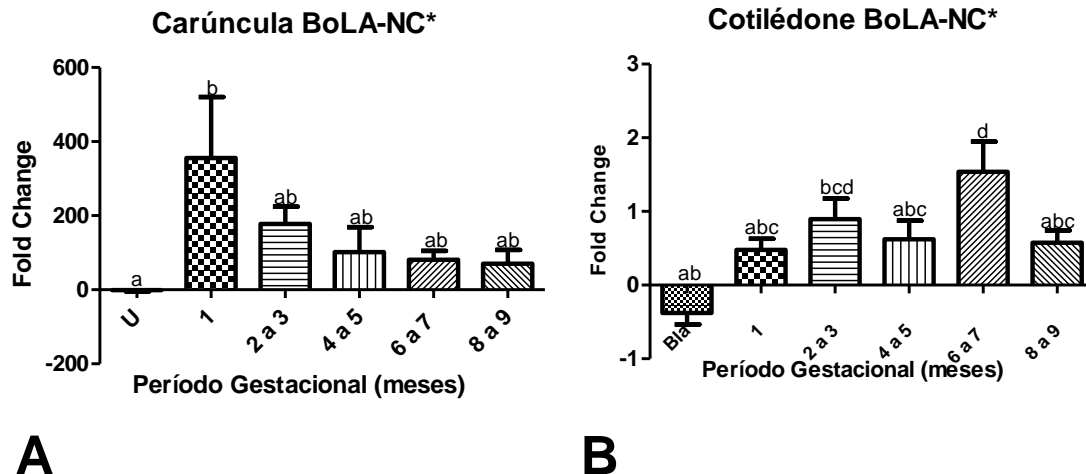


Figura 7: Quantificação de transcritos do BoLA não clássico em carúncula (A) e cotilédone (B) bovinos durante todos os períodos gestacionais (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). O útero foi usado como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e o blastócito para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. BoLA-NC* = MHC classe I não-clássico bovino, U = útero não gestante. Bla = blastocisto.

5.2.4 Quantificação de Transcritos de BoLA não clássico gene 2 (BoLA-NC2) por qPCR

As carúnculas com PG compreendido entre “2 e 3” meses apresentaram as maiores quantidades de transcrito de BoLA-NC2 quando comparada aos demais períodos gestacionais (Figura 8A). Não foram observados transcritos desta proteína no útero vazio e as carúnculas com até um mês de gestação mostraram quantidades similares às do útero não gestante (Figura 8A). Os PG gestacionais entre 4 a 9 meses apresentaram menores quantidades de transcritos do que o PG de “2 a 3” meses, porém maiores que as do útero não gestante e das carúnculas com até um mês de gestação (Figura 8A).

Os blastocistos apresentaram maiores quantidades de transcritos da molécula BoLA-NC2 do que os cotilédones nos vários PG (figura 8B).

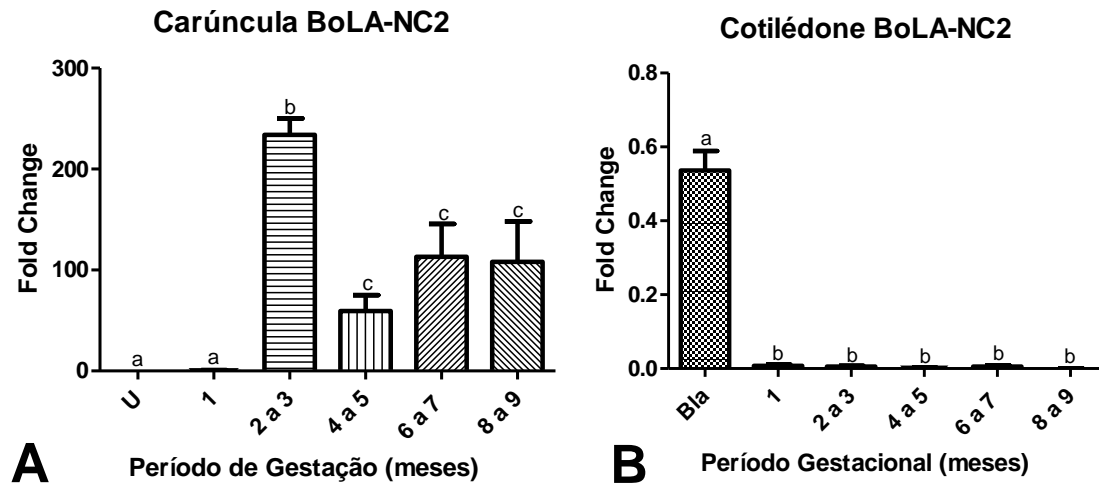


Figura 8: Quantificação relativa de transcritos de BoLA não clássico gene 2 (NC-2) em carúncula (A) e cotilédone (B) (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$) bovinos durante todos os períodos gestacionais. A média das carúnculas com 1 mês de gestação foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. BoLA-NC2 = MHC de classe I não-clássico gene 2, U = útero não gestante. Bla = blastocisto.

5.2.5 Quantificação de Transcritos de BoLA não clássico gene 4 (BoLA-NC4) por qPCR

O período gestacional “8 a 9” meses teve maior quantidade de transcritos BoLA-NC4 nas carúnculas do que o PG de “4 a 5” meses. Os demais PG e útero não gestante apresentaram níveis transcricionais similares (Figura 9A). Ao se comparar a quantidade de transcritos entre os genes de BoLA não clássicos 2 (Figura 8A) e 4 (Figura 9A) observou-se que o gene 2 (*fold change* entre, aproximadamente, 50 e 200; Figura 8A) obteve níveis transcricionais bem maiores do que os do gene 4 (*fold change* entre, aproximadamente, 1,5 e 3; Figura 9A) na parte materna da placenta bovina.

Os blastocistos não transcreveram o gene 4 de BoLA-NC* e, por isso, foram diferentes estatisticamente de todos os demais PG (Figura 9B). Já os cotilédones com até 1 mês de gestação e no PG de “6 a 7” meses apresentaram os maiores níveis transcricionais quando comparados aos PG com “4 a 5” e “8 a 9” meses (Figura 9B). Nos demais PG os níveis transcricionais de BoLA-NC4 se mantiveram constantes. Verificou-se que os níveis transcricionais de BoLA-NC4 (*fold change* entre 0,5 e 1,0; Figura 9B) em cotilédones bovinos foram ligeiramente maiores do que os níveis de BoLA-NC2 (*fold change* entre 0 e 0,5; Figura 8B).

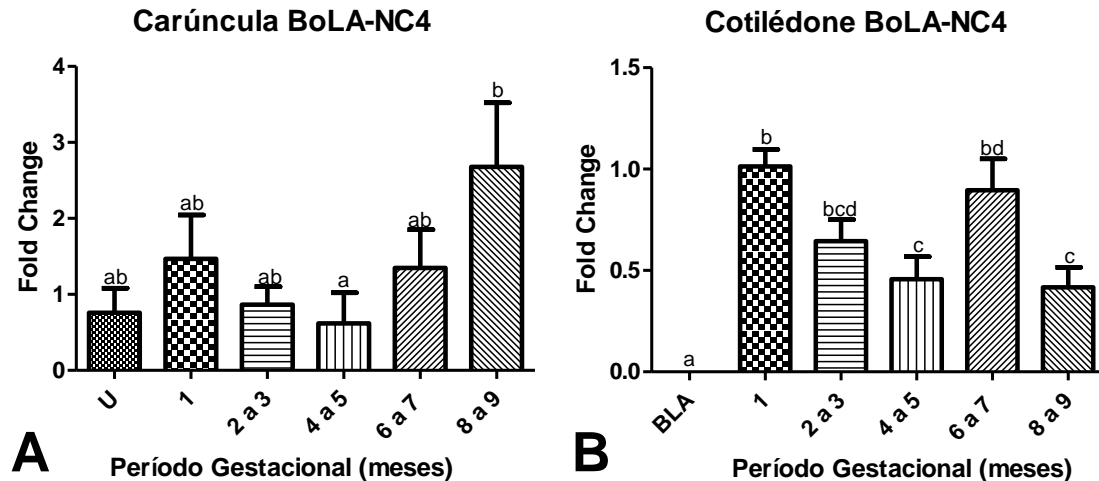


Figura 9: Quantificação relativa de transcritos de BoLA não clássico gene 4 (NC-4) em carúncula (A) e cotilédone (B) (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$) bovinos durante todos os períodos gestacionais. A média das carúnculas com um mês de gestação foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. BoLA-NC4 = MHC de classe I não-clássico gene 4, U = útero não gestante.

5.2.6 Quantificação de Transcritos do Fator de Transformação do Crescimento beta um (TGF- β 1) por qPCR

As carúnculas com PG de “6 a 7” meses apresentaram maior quantidade de transcritos, de TGF- β 1, do que o útero não gestante e as carúnculas com até 1 mês e “8 a 9” meses de gestação (Figura 10A). Nos demais PG a quantidade de transcritos de TGF- β 1 nas carúnculas se manteve constante (figura 10A).

Na parte fetal da placenta bovina não foram observadas diferenças na quantidade de transcritos de TGF- β 1 nos PG estudados (Figura 10B).

Ao se comparar as quantidades de níveis transcricionais de TGF- β 1 entre as carúnculas e cotilédones pode-se observar que os mesmos foram imensamente maiores nas carúnculas (fold change variando de 100 a 350; Figura 10A) do que nos cotilédones (fold change variando entre 0,3 a 0,8; Figura 10B).

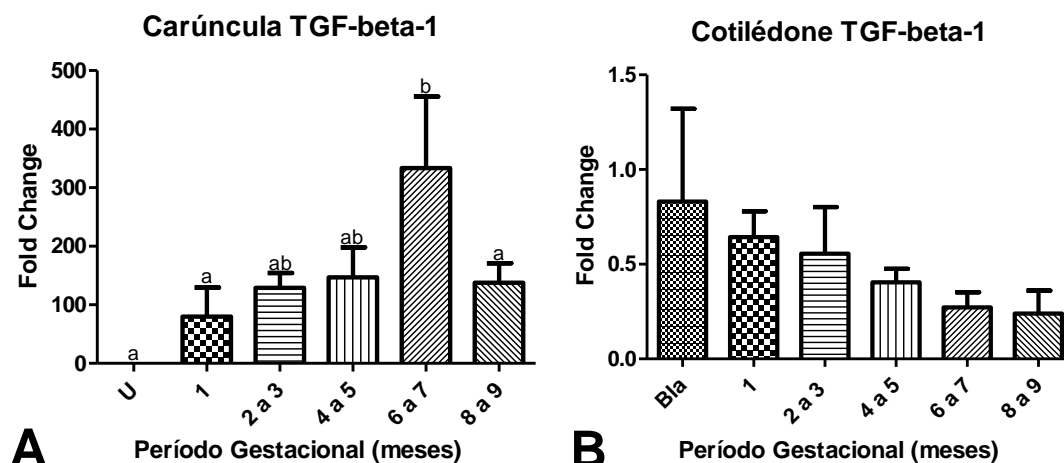


Figura 10: Quantificação relativa de transcritos de TGF- β 1 em carúnculas (A) e cotilédones (B) bovinos durante todos os períodos gestacionais (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). A média dos úteros vazios foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos pools de blastócitos para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. TGF-beta-1 = fator de crescimento tumoral beta 1. U = útero não gestante. Bla = blastocisto.

5.2.7 Quantificação de Transcritos do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) por qPCR

Na parte materna da placenta bovina o número de transcritos de TNF- α foi maior nas carúnculas com “8 a 9” meses de gestação do que no útero não gestante e no PG de “4 a 5” meses. Nos demais PG a quantidade de transcritos de TNF- α se mantiveram constantes (Figura 11A).

Os blastocistos não transcreveram a citocina TNF- α (Figura 11B). Enquanto que, nos cotilédones com PG de “2 a 3” e “8 a 9” meses foram os que apresentaram maiores níveis transcricionais desta citocina (Figura 11B).

Ao se correlacionar os níveis transcricionais do TNF- α entre as carúnculas (“fold change” entre 0 e 0,5; Figura 11A) e os cotilédones (fold change entre 0 e 1,8; Figura 11B) verificou-se que os mesmos se mantiveram em baixos níveis durante todo o período gestacional, observando-se um ligeiro aumento (fold change igual a 1,8; Figura 11B) nos cotilédones com PG de “2 a 3” meses.

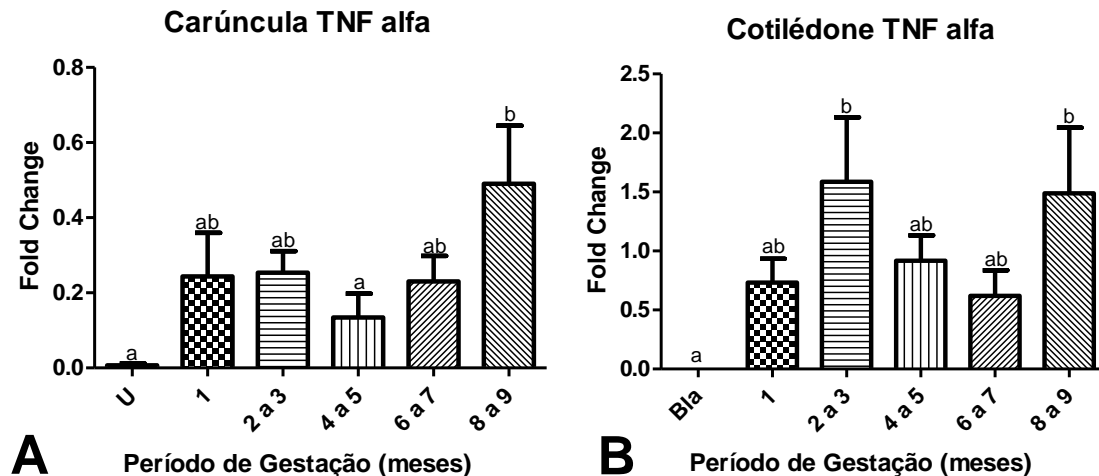


Figura 11: Quantificação relativa de transcritos de TNF- α em carúnculas (A) e cotilédones (B) bovinos durante todos os períodos gestacionais (Teste de Bonferroni, $P < 0,05$). A média das carúnculas com 1 mês de gestação foi usada como calibrador para a análise relativa dos dados das carúnculas e a média dos cotilédones com 1 mês de gestação para os cotilédones. Letras iguais sem diferença estatística, letras diferentes com diferença estatística. U = útero não gestante. Bla = blastocisto.

5.2.8 Transcritos dos genes BoLA de classe I não clássicos (NC-1 e NC-3)

A análise da eletroforese em gel de agarose 1,5% revelou que o gene 1 não clássico (NC-1) do MHC I foi expresso no útero não gestante e no cotilédone no período de gestação compreendido entre dois e três meses. Nos demais períodos gestacionais o cotilédone não expressou este gene, enquanto que a carúncula não o expressou em qualquer período da gestação. Assim, a expressão de BoLA de classe I NC-1 ocorreu no cório no período compreendido entre “2 e 3” meses de prenhez e em úteros vazios.

Observou-se a expressão do gene 3 não clássico (NC-3) de BoLA de classe I no útero não gestante, nas carúnculas durante o período gestacional de um até sete meses e no cotilédone nos tempos compreendidos entre “2 a 3” e “8 a 9” meses de gestação. Não houve expressão deste gene nas carúnculas com “8 a 9” meses e nos cotilédones com até um mês e de 4 a 7 meses de gestação (Figura 12).



Figura 12: Exemplo de eletroforese em gel de agarose 1,5% do gene não clássico 3 (NC3) do antígeno leucocitário bovino (BoLA) de classe I em carúnculas e útero bovinos. Legenda: M = marcador de 100pb, amostras 1, 12 e 15 = carúnculas com até 1 mês, 4, 9 e 10 = carúnculas com “2 a 3” meses, 5, 13 e 14 = carúnculas com “4 a 5” meses, 2, 6 e 8 = carúnculas com “6 a 7” meses, 3, 7 e 16 = carúnculas com “8 a 9” meses de gestação e 11 = útero não gestante.

6 DISCUSSÃO

6.1 Antígeno Leucocitário Bovino (BoLA) de classe I

O MHC de classe I bovino é dividido em dois tipos, um com alto polimorfismo, denominado clássico (BoLA-N*) e outro com baixo polimorfismo, chamado de não clássico (BoLA-NC*). O BoLA-N* possui seis ou mais genes expressos em diferentes combinações (ELLIS et al, 1998; BIRCH et al., 2006; HAMMOND et al., 2012), enquanto que o não clássico possui nove seqüências que são codificadas em quatro loci distintos, NC1-4 (BIRCH et al., 2008; HAMMOND et al., 2012). Utilizou-se um *forward* e dois reversos diferentes capazes de quantificar todos os loci de BoLA total e um par de *primers* para quantificar todos os genes do BoLA clássico (DAVIES, FISHER, SCHLAFFER, 2000). Extrapolou-se, matematicamente, o valor quantitativo destes três primers e quantificou-se o BoLA não clássico total, contendo todos os quatro genes do BoLA-NC*.

A análise sobre a expressão de BoLA no reconhecimento imunofisiológico do aloenxerto fetal por parte materna forneceu informações a respeito da interação materno fetal durante a gestação, importantes para a eficiência reprodutiva do rebanho bovino.

6.2 Parte fetal da placenta

O baixo nível transcricional (*fold changes* 0-2,5) de BoLA total, BoLA clássico total e BoLA não-clássico total encontrados nos cotilédones contribui no sucesso do desenvolvimento fetal durante a gestação, pois desta forma o feto passa quase que imperceptivelmente pelo reconhecimento do sistema imune materno. Este fato pôde ser comprovado em nossos ensaios de imunofluorescência, onde muito pouca marcação foi observada nas células presentes nos cotilédones, destacando assim, que em estudos deste tipo pelo menos duas metodologias devem ser utilizadas para validar o experimento. Outro achado interessante foi o de que as células trofoblásticas binucleadas geralmente apresentavam mais marcação do que as células trofoblásticas com apenas um núcleo. Bainbridge et al. (2001) também verificaram a transcrição de genes BoLA clássico e de um gene não clássico em trofoblastos binucleados.

Observou-se, também, na análise imunohistoquímica por fluorescência, que as células do trofoblasto e a massa celular indiferenciadas, de blastocistos expandidos, não tinham marcação para BoLA de classe I, mas a zona pelúcida apresentava uma forte marcação deste anticorpo. Esta marcação da zona pelúcida também esteve presente em ovócitos não

fertilizados, fato que confirmou a origem de marcação de BoLA materno presente na zona pelúcida e que persiste até a eclosão do blastocisto, quando há o rompimento da zona pelúcida. Isso se deve fazer parte do mecanismo imunofisiológico protetor do organismo materno, permitindo, assim, a livre passagem do embrião pela tuba uterina, sem que ocorra a aderência deste, fazendo com que não haja a implantação embrionária ectópica. Consequentemente, ocorrendo à implantação embrionária apenas no corno uterino, com a subsequente ruptura da zona pelúcida.

Acredita-se que no início do desenvolvimento do embrião seu mRNA seja de origem materna, até que o embrião possa expressar seu próprio mRNA. Os achados de mRNA de BoLA nos blastocistos foram condizentes com esta afirmação, já que este mRNA BoLA encontrado nos transcritos de blastocistos pode ser em virtude da origem materna desta proteína, antes do transcriptoma BoLA embrionário ser completamente ativado e regulado (YAO et al., 2005; DOYLE et al., 2009). No entanto, houve pouca marcação por imunofluorescência nas células dos embriões com zona pelúcida, provavelmente pela dificuldade dos anticorpos ultrapassarem esta estrutura.

Fernandez et al. (1999) observaram que a expressão de BoLA clássico é pouco regulada em ovócitos maduros, células espermáticas maduras e embriões em desenvolvimento, enquanto que a expressão de BoLA não clássico pode ser detectado em células precursoras de espermatozóides e ovócitos fertilizados e é altamente regulada durante os primeiros estágios de clivagem.

Com a utilização da RT-qPCR para quantificação de BoLA de classe I, verificou-se uma maior quantidade de transcritos nos blastocistos do que nos grupos cotiledonares. Estudos mostraram que transcritos mRNA de BoLA foram detectados em todos os estágios de desenvolvimento embrionário, desde a coleta do ovócito imaturo até a fase de blastocisto. Esta presença de transcritos de BoLA nos blastocistos é importante para o rápido desenvolvimento do embrião bem como para a qualidade destes embriões bovinos (DOYLE et al., 2009). Entretanto, a quantidade desses transcritos foi muito pequena, o que não geraria uma resposta imune intensa contra este embrião, a ponto de ocorrer uma reabsorção embrionária.

O contato íntimo entre a placenta fetal e as células uterinas tem seu início entre a quarta e quinta semana de gestação em vacas, pois primeiro o córion sofre um alongamento, para depois formar os cotilédones com seus microvilos que se interdigitam nas áreas das criptas carunculares, prosseguindo, assim, com o desenvolvimento dos placentomas (ELLIS et al., 1999; DOYLE et al., 2009). Acredita-se, também, que este processo de invaginação do

cotilédone na carúncula, durante o primeiro trimestre de gestação em ruminantes, cause uma supressão de BoLA (HILL et al., 2002).

O cultivo de células do trofoblasto mostrou que estas células aumentam a expressão de BoLA de classe I ao final da gestação, o que pode contribuir para a maturação do conceito e a não retenção de placenta (REXROAD, CASIDA, TYLER, 1974; DAVIES, FISHER, SCHLAFFER, 2000; LOW et al., 1990; HILL et al., 2002).

Os blastocistos apresentaram maiores quantidades de transcritos do gene 2 de BoLA não clássico que os cotilédones nos vários PG, possivelmente, porque ele deva atuar apenas em casos específicos como na manutenção da gestação. Isso sugere semelhança com a função do antígeno leucocitário humano G (HLA-G), o qual é expresso especificamente em citotrofoblastos invasivos e pode proteger estas células do ataque pelos linfócitos T e/ou células *natural killer* (NK) (YAO, BARLOW, SARGENT, 2005). Por outro lado os bovinos têm um perfil baixo de células NK e possuem grande população de macrófagos que são recrutados do endométrio e promovem o crescimento do trofoblasto através da secreção de citocinas mitogênicas (OLIVEIRA et al., 2010).

A expressão do gene 4 de BoLA não-clássico foi muito baixa, pois o *fold change* variou entre 0,5 e 1 nos blastocistos e cotilédones durante todo o PG estudado ao longo da gestação; enquanto que, os BoLAs de classe I (totais e totais clássico e não-clássico) tiveram seu *fold change* variando de zero até 5 nos cotilédones e blastocistos. Observou-se, também, que os níveis transcricionais de BoLA-NC4 (*fold change* entre 0,5 e 1,0) em cotilédones bovinos foram ligeiramente maiores do que os níveis de BoLA-NC2 (*fold change* entre 0 e 0,5).

Os blastocistos não expressaram BoLA-NC4, o que conferiu diferença estatística entre este e os demais grupos cotiledonares. O período gestacional com até um mês e de “6 a 7” meses tiveram quantidade maior de BoLA-NC4 do que os PG “4 a 5” e “8 a 9” meses. A baixa expressão deste gene não clássico ao longo da gestação é indicativo da supressão deste gene visando garantir o sucesso gestacional. Sabe-se (NAIB et al., 2011) que a citocina anti-inflamatória IL-10 aumenta a expressão de BoLA-NC4, bem como modula o desenvolvimento da resposta humoral ou Th2, desta forma o conceito tenta passar de forma despercebida pelo sistema imune materno.

6.3 Parte materna da placenta e útero não gestante

As carúnculas apresentaram concentrações maiores de transcritos de BoLA total, BoLA clássico total e BoLA não-clássico total, quando comparadas a expressão deste complexo aos cotilédones. A parte materna da placenta expressaram maior quantidade de BoLA-NC* do que BoLA-N* e transcreveram mais BoLA-NC2 do que BoLA-NC4. Já o útero não gestante expressou menos BoLA de classe I total, clássico total e não clássico total, bem como BoLA-NC4, quando comparado as carúnculas. Este tecido não expressou BoLA-NC2. Provavelmente isto se deve ao próprio sistema de placentação bovina, onde não há um íntimo contato entre as placentas materna e fetal, que é do tipo epitélio-corial, apesar de alguns autores, às vezes, a considerarem sindesmo-corial em alguns momentos, quando há a formação dos trofoblastos trinucleados.

Ao comparar gestações naturais e de clones, entre 34 e 63 dias de gestação, alguns pesquisadores (HILL et al., 2002) constataram que apesar da expressão do MHC-I no endométrio materno ter sido similar em ambas as gestações, observou-se grande abundância de epitélio endometrial colunar positivo para BoLA na gestação de clones.

Outro processo que pode estar ocorrendo, seria a diminuição da ligação entre as células naturais *killer* do grupo 2 (NKG2) presentes no endométrio e as moléculas do tipo 2 de cadeia relacionadas (MIC2) ao MHC de classe I (PENG et al., 2011). Isto leva a supressão dos leucócitos polimorfonucleares citotóxicos (PENG et al., 2011). Esta baixa expressão foi observada por Peng et al. (2011) nos primeiro e segundo trimestre de gestação bovina. Estes autores relataram, também, um aumento desta expressão durante o parto de vacas leiteiras. Deste modo, o embrião consegue escapar da resposta imune materna.

O tecido uterino não gestante não produziu transcritos de BoLA-NC2, mas esta glicoproteína não clássica bovina foi observada durante a gestação tanto na parte materna como na parte fetal da placenta. Provavelmente esta molécula tem alguma função imunomodulatória de citocinas e/ou quimiocinas para garantir o desenvolvimento placentário e embrionário. Através da extrapolação matemática da quantificação da qPCR para o cálculo de BoLA não-clássico total, pode-se notar que os outros genes de BoLA não clássicos (NC*) foram transcritos em alguns momentos da gestação, demonstrando, também, que exercem alguma imunomodulação visando garantir o sucesso da gestação.

A expressão do gene 4 de BoLA não-clássico foi muito baixa, pois o *fold change* variou entre 1 e 2,5 nas carúnculas e tecido uterino ao longo da gestação. Enquanto que, os BoLAs tiveram seu *fold change* variando de zero até 400 nas carúnculas e tecidos uterinos. A

baixa expressão deste gene não clássico ao longo da gestação é um indicativo da imunossupressão deste gene visando garantir o sucesso gestacional.

As análises das eletroforeses em gel de agarose 1,5% da RT-PCR convencional mostraram que a expressão dos genes BoLA-NC1 e NC3 ocorreram em tecidos de úteros não gestantes. Com relação às carúnculas visualizou-se que o gene BoLA-NC1 não esteve presente nas mesmas; enquanto que o gene BoLA-NC3 ocorreu nas carúnculas com PG que variaram de 1 a 7 meses. Supõem-se que a maioria das isoformas de BoLA-NC* parecem ser proteínas secretadas, as quais devem atuar como fatores imunossupressivos (KING, ATKINSON, ROBERTSON, 1982). De fato, isto deve ser pertinente, pois encontrou-se a presença de transcritos de NC 1 e 3 entre os períodos gestacionais que antecedem o parto.

A ausência de BoLA NC1 nas carúnculas pode revelar a deficiência de um processo inflamatório induzido pelo interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) (NAIB et al., 2011), levando ao sucesso gestacional destes fetos. A presença de BoLA NC2, NC3 e NC4 durante a gestação mostrou que estas moléculas não clássicas de MHC de classe I estão modulando o sistema imune de forma a favorecer uma resposta imune do tipo dois (Th_2) (NAIB et al., 2011) para garantir o sucesso da gestação. A citocina inflamatória $\text{IFN-}\gamma$ causa uma regulação negativa dos genes BoLA NC-2, NC-3 e NC-4. Em compensação esta citocina aumenta a amplificação de transcritos de BoLA que amplifica a maioria das sequências de BoLA total e os alelos de BoLA NC-1 (NAIB et al., 2011).

A IL-4, uma citocina anti-inflamatória, regula positivamente a expressão de BoLA-NC1, NC2 e NC4 em blastocistos bovinos. Geralmente esta citocina é encontrada no endométrio durante a fase de pré-implantação do blastocisto, onde ela aumenta a produção de outras citocinas, criando um meio favorável à gestação, devido a mudança do estado Th_0 para Th_2 . Já a IL-10, também anti-inflamatória, aumenta a expressão de BoLA-NC4. Esta citocina modula o sistema imune e promove o desenvolvimento da resposta humoral ou Th_2 . O aumento na expressão de BoLA-NC3 é estimulado pela IL-3, que parece exercer uma função na proliferação do trofoblasto. (NAIB et al., 2011).

6.4 Citocinas

Tendo em vista que $\text{TGF-}\beta$ (fator de crescimento transformador beta 1) é uma citocina anti-inflamatória pleiotrópica que regula a embriogênese, verificou-se que a quantidade de transcritos desta citocina nos blastocistos e cotilédones foram as mesmas durante todo o PG. Já o PG entre “6 a 7” meses da parte materna da placenta, transcreveram mais $\text{TGF-}\beta$ do que

os demais PG e o útero não gestante. Assim, TGF- β parece ser uma das citocinas responsável pelo desenvolvimento fetal na cavidade uterina. Estudos (SAITO et al., 2010) mostram que a TGF- β é uma citocina chave que regula a linhagem Th₁₇/Treg, ou seja, faz um balanço entre os processos inflamatórios e de rejeição (Th₁₇) e regulatórios (Treg), pois esta citocina é requerida tanto para a diferenciação das células T em Th₁₇ como em Treg.

Verificou-se que o número de transcritos de TNF- α foi maior nas carúnculas durante o PG compreendido entre “8 a 9” meses e menor na parte materna da placenta no PG de “4 a 5” meses, bem como, no útero não gestante. Transcritos desta citocina foram ausentes nos blastocistos. Mas a expressão de TNF- α foi maior nos cotilédones quando comparados às carúnculas. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que pode ser amplificada pelas células CD8⁺ sensibilizadas com antígenos paternos expressos pelo feto, danificando-se os anexos fetais levando a infartos placentários ou deslocamentos da placenta ocasionando óbitos perinatais. É desejável que esta citocina seja expressa ao final da gestação, para facilitar o parto e expulsão da placenta.

6.5 Considerações finais

Optou-se por analisar o tecido materno e o tecido fetal como um todo, sem separar as células do epitélio uterino e trofoblasto nos testes de imunofluorescência ou separando cotilédone de carúncula nos ensaios de qPCR, durante todo o período gestacional, que foi de 20 dias a 9 meses de gestação. Desta forma, as observações estariam mais perto do que realmente está ocorrendo na imunofisiologia *in vivo* no animal gestante. Sendo assim, temos nestes tecidos a presença de outras células, tais como, fibroblastos, macrófagos, células do mesênquima (cório) e células endoteliais, que podem estar envolvidas na modulação do sistema imune, atuando conjuntamente através da modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como de hormônios, para manter os níveis transcricionais de BoLA de classe I baixos.

Diante dos achados anteriormente descritos pondera-se que o BoLA está presente em níveis transcricionais baixos na parte fetal da placenta, e, apesar de as carúnculas apresentarem quantidade de transcritos um pouco mais elevadas do que nos cotilédones, estes transcritos se mantiveram constantes durante a gestação. Assim, o feto não é reconhecido como um corpo estranho, garantindo o sucesso da gestação. Sem contar que a própria anatomia da placenta bovina, devido à presença de carúnculas e cotilédones como pontos de união entre mãe e feto, deve auxiliar nesta interação materno-fetal. Além de que outros sistemas devem estar

envolvidos visando garantir a manutenção da gestação, tais como a produção hormonal, que muda conforme o período de gestação, a produção de citocinas e quimiocinas, entre outros fatores que virão a ser descobertos. Mais estudos necessitam ser realizados para o entendimento dos mecanismos imunofisiológicos da gestação em vaca.

Durante a avaliação de expressão do MHC de classe I em bovinos (BoLA) constatou-se que existe uma quantidade de transcritos de BoLA sendo expressa durante todo o período gestacional, tanto na parte materna da placenta quanto no tecido fetal placentário. A mesma, devido a sua baixíssima expressão nos cotilédones e blastocistos, não interfere na placentação e desenvolvimento do embrião/feto.

Apesar das carúnculas expressarem transcritos de BoLA em quantidades maiores que o tecido fetal placentário, estes também não interferem com a placentação. Na maioria dos genes testados os níveis transcricionais se mantiveram constantes durante todo o período gestacional estudado.

Verificou-se a existência de transcritos de BoLA, mas não examinou-se quantitativamente pelo ELISA a presença de proteínas de BoLA, em virtude da dificuldade em se encontrar reagentes, anticorpos, antígenos e outros produtos específicos para a espécie bovina. Caso fosse utilizada a extrapolação com produtos de outra espécie, a mesma não forneceria dados fidedignos a respeito da mensuração de proteínas bovinas.

A imunofluorescência utilizada não pôde ser avaliada quantitativamente. Por isso, não se pode precisar o quanto os transcritos estão produzindo proteínas, pois às vezes existem transcritos que ficam armazenados e vão produzir as proteínas em algum outro momento, que não aquele onde estão sendo produzidos. Estes transcritos poderiam estar sendo armazenados para que ocorra uma alta produção protéica durante o período de parto, onde espera-se que haja uma super expressão de BoLA de classe I, com conseqüente aumento da expressão de citocinas inflamatórias propiciando a expulsão do conceito e da placenta.

Benedictus et al. (2012) observaram que fetos que possuem os mesmos haplótipos de BoLA que os maternos, e vice versa, ou seja, a ocorrência de compatibilidade de MHC de classe I materno-fetal, apresentam maior risco para retenção de placenta. Isto reflete a importância da presença de haplótipos diferentes entre mãe e feto, oriundo da parte paterna na formação fetal, para o processamento adequado do parto, culminando tanto no nascimento do feto como na expulsão do tecido placentário, o que evita infecções subseqüentes do endométrio. Assim, a compatibilidade do MHC de classe I entre mãe e feto pode influenciar o comportamento dos macrófagos fetais, bem como a liberação de citocinas inflamatórias tanto dos macrófagos fetais como dos maternos durante o processo do parto (DAVIES et al., 2004).

Portanto, os sistemas imunes materno e fetal atuam coordenadamente no processo de rejeição e aceitação imune mediada das membranas fetais durante o parto (BENEDICTUS et al., 2012). No presente trabalho não foram avaliadas placentas a termo, por problemas éticos. Não deveriam existir abates nem mesmo de animais com mais de seis meses de gestação, mesmo assim foram obtidas placentas de gestação de oito meses, mas não de gestação a termo. Portanto, um possível aumento da transcrição de qualquer dos BoLAs, momentos antes do parto, não pôde ser avaliado.

Outra hipótese seria referente às moléculas de processamento antigênico (APM), como TAP-1 e TAP-2 (Transportador Associado ao Processamento de Antígeno), bem como de tapasina, que transporta peptídeos antigênicos através da membrana do retículo endoplasmático. Estas podem estar ausentes ou fracamente presentes no endométrio e, deste modo, o *pool* de peptídeos paternos, presentes na parte fetal da placenta, não podem se ligar aos dímeros de BoLA. Deste modo, ocorreria a inibição das cadeias leve e pesada do complexo MHC de classe I ao deixar o retículo endoplasmático (SUÁREZ-ALVAREZ et al., 2010) dos linfócitos uterinos materno, limitando, assim a expressão de BoLA.

A função do MHC de classe I é apresentar peptídeos ao sistema imune. Uma molécula de MHC só pode estimular a resposta imune se houver conjugação de um peptídeo com a fenda de uma molécula do MHC (TZARD, 2002; ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008). Para que isso ocorra, é necessária a ligação de antígenos paternos ao MHC materno por meio da sinalização de receptores do MHC, bem como, a ocorrência da quebra destas proteínas antigênicas paternas para a liberação dos peptídeos paternos a serem apresentados pelas APM. Deste modo, haveria uma falha no processamento de apresentação dos peptídeos paternos para os linfócitos maternos. Assim, pequenas quantidades de BoLA clássica e não clássica podem ser produzidas em cotilédones e carúncula, sem variações durante a gestação, não sendo evidente maior produção no final de gestação e, portanto, não influenciando a maturação placentária.

Pode-se concluir que existe uma imunomodulação de BoLA e citocinas anti (TGF- β 1) e pró (TNF- α) inflamatórias, tanto da placenta materna quanto da placenta fetal bovinas, visando garantir a viabilidade fetal, culminando com o sucesso de uma gestação levada a termo.

7 CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos conclui-se que:

1- a transcrição de BoLA de classe I não clássico, nos cotilédones, foi maior do que a transcrição de BoLA de classe I clássico. Já os blastocistos transcreveram mais BoLA de classe I clássico do que BoLA de classe I não clássico. Apesar da verificação da presença de transcritos de BoLA em cotilédones e blastocistos, em ambos os grupos a quantidade de transcritos foi pequena;

2- houve transcrição de uma pequena quantidade de BoLA-NC2, nos blastocistos, a qual foi maior do que a transcrição obtida para os cotilédones;

3- os blastocistos não transveram BoLA-NC4, mas os cotilédones transcreveram uma pequena quantidade deste MHC de classe I não clássico;

4- as carúnculas apresentaram grandes quantidades de transcritos que foram maiores nos períodos gestacionais de “8 a 9” para BoLA de classe I clássico e até 1 mês para BoLA de classe I não-clássico;

5- as carúnculas transcreveram mais BoLA-NC2 do que BoLA-NC4.

6- a transcrição de BoLA de classe I clássico e não-clássico foi menor no útero não gestante do que nas carúnculas;

7- não há transcrição de BoLA NC-2 no útero não gestante, mas há uma pequena quantidade de transcritos de BoLA-NC4 neste tecido;

8- a presença de grandes quantidades de transcritos de BoLA-NC2 nas carúnculas parece proteger o feto da rejeição;

8- existe, nas carúnculas, um pico de transcrição de TGF- β 1 no sexto e sétimo meses de gestação, justamente quando o feto tem seu maior crescimento, sinalizando um provável envolvimento desta citocina neste fenômeno.

9- TNF- α surge em maior quantidade no final da gestação (“8 e 9” meses), tanto nas carúnculas quanto nos cotilédones, demonstrando o início de uma reação inflamatória, necessária para a adequada expulsão do conceito e da placenta durante o parto.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A.K.; LICHTMAN A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. **Elsevier**: Rio de Janeiro, 6 ed., 2008, 564p.

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.

AMOROSO, E.C.; PERRY, J.S. The existence during gestation of an immunological buffer zone at the interface between maternal and fetal tissues. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 271, p. 343 – 361, 1975.

ARAÚJO, M.C.C.; VALE FILHO, V.R.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; BARRETO FILHO, J.B.; CAMARGO L.S.A.; SERAPIÃO, R.V.; SILVA, M.V.G.B. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* frescos e congelados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 751 – 756, 2006.

ARNOLD, D.R.; BINELLI, M.; VONK, J. et al. Intracellular regulation of endometrial PGF2 α and PGE2 production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon- τ . **Domestic Animal Endocrinology**, v.18, p. 199 - 216, 2000

AUSTGULEN, R.; ISAKSEN, C.V.; CHEDWICK, L.; ROMUNDSTAD, P.; VATTEN, L.; CRAVEN, C. Pré-eclampsia associated with increased syncytial apoptosis when the infant is small-for-gestational-age. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 61, p. 39-50, 2004.

BAINBRIDGE, D. R.; SARGENT, I. L.; ELLIS, S. A. Increased expression of major histocompatibility complex (MHC) class I transplantation antigens in bovine trophoblast cells before fusion with maternal cells. **Reproduction**, v. 122, p. 907–913, 2001.

BARRETO FILHO, J.B.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Aspectos histológicos da placenta de vacas Zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, p. 385–393, 1993.

BAUD V, KARIN M: Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biology**, v. 11, p. 372–377, 2001.

BAUER, S.; POLLHEIMER, J.; HARTMANN, J.; HUSSLEIN, P.; APLIN, J.D.; KNOFLER, M. Tumor necrosis factor- α inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in firsttrimester villous explant cultures. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**; v. 89, p.812–822, 2004.

BENEDICTUS, L.; THOMAS, A.J.; JORRITSMA, R.; DAVIES, C.J.; KOETS, P. Two-way calf to dam major histocompatibility class I compatibility increases risk for retained placenta in cattle. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, p. 224–230, 2012.

BENETONE, M.Z. **Apoptose e proliferação na placenta de búfalas**. 2005. 186f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BENEVIDES, L.; MILANEZI, C.M.; YAMAUCHI, L.M.; BENJAMIM, C.F.; SILVA, J.S.; SILVA, N.M. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 3, p. 741-751, 2008.

BIRCH J., CODNER G., GUZMAN E. Genomic location and characterization of nonclassical MHC class I genes in cattle. **Immunogeneticas**, v. 60, p. 267-273, 2008.

BIRCH, J.; MURPHY, L.; MACHUGH, N.D.; ELLIS, S.A. Generation and maintenance of diversity in the cattle MHC class I region. **Immunogenetics**, v. 58, p. 670–679, 2006.

BOOS, A.; JANSSEN, V.; MÜLING, C. Prolifiration and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cow retaining the fetal membranes. **Reproduction**, v. 126, p. 469-480, 2003.

BURTON GJ, JAUNIAUX E: Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 11, p. 342–352, 2004.

CALLEJA-AGIUS J, JAUNIAUX E, MUTTUKRISHNA S. Placental villous expression of TNF α and IL-10 and effect of oxygen tension in euploid early pregnancy failure. **American Journal of Reproductive Immunology**, doi:10.1111/j.1600-0897.2012.01104.x, 2012.

CATTINI, P.A.; NICKEL, B.; BOCK, M.; KARDAMI, E. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in growing and growth-inhibited placental cells: a possible role of bFGF in placental cells development. **Placenta**, v. 12, p. 341-352, 1991.

CENCIC A, GUILLOMOT M, KOREN S, LA BONNARDIÈRE C. Trophoblastic interferons: do they modulate uterine cellular markers at the time of conceptus attachment in the pig? **Placenta**, v. 24, p. 862-869, 2003.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança**, Uberlândia: EDUFU (editora UFU). p. 55, 1997.

CHEN W, JIN W, HARDEGEN N *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- regulatory T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1875-86, 2003.

CHEIFETZ S, HERNANDEZ H, LAIHO M, ten DIJKE P, IWATA KK, MASSAGUE J. Distinct transforming growth factor- γ (TGF- β) receptor subsets as netalza-d-e terminants of cellular responsiveness to three TGF- β isoforms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 20533-20538, 1990.

CROY BA, van den HEUVEL MJ, BORZYCHOWSKI AM, TAYADE C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. **Immunological Reviews**., v. 214, p. 161-185, 2006.

DAS, S.K.; FLANDERS, K.C.; ANDREWS, G.K.; DEY, S.K. Expression of transforming growth factor- β isoforms (2 and 3) in the mouse uterus: I analysis of the periimplantation period and effects of ovarian steroids. **Endocrinology**, v. 130, p. 3459-3466, 1992.

DAVIES, C.J.; ELDRIDGEL, 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, p. 188–200, 2006.

DAVIES, C.J.; FISHER, P.J.; SCHLAFFER, 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.; HILL, J.R.; EDWARDS, J.L.; SCHRICK, F.N.; FISHER, P.J.; ELDRIDGE, J.A.; SCHLAFFER, D.H. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p.267–280, 2004.

DENT, J.; MCGOVERN, P.T.; HANCOCK, J.L. Immunological implications of ultrastructural studies of goat X sheep hybrid placenta. **Nature**, v. 231, p. 116–117, 1971.

DIJKE, P.; HANSEN, P.; IWATA, K.K.; PIELER, C.; FOULKES, J.G. Identification of another member of the transforming growth factor type β gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences: USA**, v. 85, p. 4715-4719, 1988.

DINIZ, E.G.; ESPER, C.R.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 70-76, 2005.

DORÉ, J.J.E.; WILKINSON, J.E.; GODKIN, J.D. Early gestational expression of transforming growth factor beta isoforms by the ovine placenta. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 143-152, 1995.

DOYLE, J.; ELLIS, S.A.; O’GORMANA, G.M.; DONOSOA, I.M.A.; LONERGAN, L.; FAIR, T. Classical and non-classical Major Histocompatibility Complex class I gene expression in in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 82, p. 48–56, 2009.

EDEY, T.N. Prenatal mortality in sheep: a review. **Animal Breeding Abstract**, v. 37, p. 173-190, 1969.

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. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, p. 103 – 115, 1998.

FARIA, B.A.; SILVA, S.M.; ABREU, M.T.C.L.; NAPIMOGA, M.H.. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 309-315, 2008.

FERNADEZ, N.; COOPER, J.; SPRINKS, M.; ABDELRAHMAN, M.; FISZER, D.; KURPIZ, M.; DEATRY, G. A critical review of the role of the major histocompatibility complex in fertilization, preimplantation, development and feto-maternal interaction. **Human Reproduction Update**, v. 5, p. 234-248, 1999.

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.

GRAHAM, C.H.; LYSIAK, J.J.; MCCRAE, K.R.; LALA, P.K. Localization of transforming growth factor- β at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 561-572, 1992.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H. Obstetrícia Veterinária. **Editora Sulina**, Porto Alegre, p. 27 – 138, 1982.

GRUNIG, G.; ANTCZAK, D.F. Horse trophoblasts produce tumor necrosis factor alpha but not interleukin 2, interleukin 4, or interferon gamma. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 531-539, 1995.

GUNNINK, J.W. Retained placenta and leucocytic activity, pre-partum leucocytic activity and its relationship to cesarean section and retained placenta. Influence of dilution on the chemotatic properties of cotyledon suspensions. **The Veterinary Quarterly**, v. 6, p. 49-104, 1984.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. **Manole**: São Paulo, 7ed., 2004.

HAIDER, S.; KNOFLER, M: Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. **Placenta**, v. 30, p. 111–123, 2009.

HAMMOND, J.A.; MARSH, S.G.E.; ROBINSON, J.; DAVIES, C.J.; STEAR, M.J.; ELLIS, S.A. Cattle MHC nomenclature: is it possible to assign sequences to discrete class I genes? **Immunogenetics**, v. 64, p. 475–480, 2012. DOI 10.1007/s00251-012-0611-7

HARA, M.; KINGSLEY, C.I.; NIIMI, M.; *et al.* IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 3789–96, 2001.

HASHIZUME, K.; USHIZAWA, K.; PATEL, O.V.; KIZAKI, K.; IMAI, K.; YAMADA, O.; NAKANO, H.; TAKAHASHI, T. Gene expression and maintenance of pregnancy in bovine: roles of trophoblastic binucleate cell-specific molecules. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 79–90, 2007.

HATTHACHOTE, P.; GILLESPIE, J.I. Complex interactions between sex steroids and cytokines in the human pregnant myometrium: evidence for an autocrine signaling system at term. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2533–40, 1999.

HILL, J.A.; CHOI, B.C. Immunodystrophism: evidence for a novel alloimmune hypothesis for recurrent pregnancy loss involving Th1-type immunity to trophoblasts. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 18, n. 4, p. 401–405, 2000.

HILL, J.R.; SCHLAFFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 55–63, 2002.

HUNT, J.S. Stranger in a strange land. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 21, p. 36–47, 2006

IGWEBUIKE, U.M. Trophoblast cells of ruminant placenta – a minireview. **Animal Reproduction Science**, Article In Press, p. 1 – 14, 2005.

JAVELAUD, D.; MAUVIEL, A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 7, p. 1161–5, 2004.

JAVELAUD D, MAUVIEL A. Transforming growth factor-betas: small signaling and roles in physiopathology. **Pathologie Biologie**: Paris, v. 52, n. 1, p. 50-54, 2004.

JOHNSON, M. Origins of pluriblast and trophoblast in the eutherian conceptus. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 699 – 709, 1996.

JOOSTEN, I.; SANDERS, M.F.; HENSEN, E.J. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the a etiology of bovine retained placenta. **Animal Genetic**, v. 22, p. 455–463, 1991.

JOOSTEN, I.; HENSEN, E.J. Retained placenta: an immunological approach. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 451–461, 1992.

KING GJ, ATKINSON BA, ROBERTSON HA. Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, p. 469–474, 1981.

KING, G.J.; ATCKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 17 – 30, 1982, Supplement.

KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells. **Anatomy and Embryology**: Berlim, v. 200, p. 229-237, 1999.

KOETS, A.P. SCHWARTZ, N.; TOOTEN, P.; KANKOFER, M.; BROEKHUIJSEN-DAVIES, J.M.; RUTTEN, V.P.M.G.; VAN LEENGOED, L.A.M.G.; TAVERNE, M.A.M.; GRUYS, E. Release of proinflammatory cytokines related to luteolysis and the periparturient acute phase response in prostaglandin-induced parturition in cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 797-812, 1998.

LASS, A.; WEISER, W.; MUNAFO, A.; LOUMAYE, E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. **Fertility and Sterility**., v. 76, p. 1091–6, 2001.

LEISER, F.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**: Germany, v. 12, p. 122-134, 1994.

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.

LIM, J.M.; HANSEL, W. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized in vitro and cultured singly in a defined medium. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1199–1205, 1996.

LIM, K.J.; ODUKOYA, O.A.; AIJAN, R.A.; LI, T.C.; WEETMAN, A.P.; COOKE, I.D. The role of T-helper cytokines in human reproduction. **Fertility and Sterility.**, v. 73, n. 1, p. 136-42, 2000.

LIN, H.Y.; QIAN, D.; ZHANG, X.; LIU, G.Y.; WANG, H.M.; ZHU, C. Gene expression of transforming growth factor-h receptors types I and II in rat endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Life Sciences**, v. 78, p. 2669 – 2675, 2006.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.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.

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

MARZI, M.; VIGANO, A.; TRABATTONI, D.; VILLA, M.L.; SALVAGGIO, A.; CLERICI, E.; et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human placenta. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 106, n. 1, p. 127-133, 1996.

MARQUES JÚNIOR, J.E.B. **Estudo comparativo da distribuição temporal do sistema VEGF na placenta de cães e de bovinos**. 2006. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 140p. 2006.

MAURER, R.R.; CHENAULT, J.R. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonporous beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 1186-1189, 1983.

MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Nature Reviews – Immunology**, v. 6, p. 584 – 5094, 2006.

MOFFETT, A.; LOKE, Y. W.; MCLAREN, A. The Biology and Pathology of Trophoblast, **Cambridge University Press**, Cambridge, 2006.

MONZON-BORDONABA, F.; VADILLO-ORTEGA, F.; FEINBERG, R.F. Modulation of trophoblast function by tumor necrosis factor-alpha: a role in pregnancy establishment and maintenance? **American Journal of Obstetrics and Gynecology** v. 187, p. 1574–1580, 2002.

MURPHY, S.P.; TAYADE, C.; ASHKAR, A.A.; HATTA, K.; ZHANG, J.; CROY, B.A. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. **The Society for the Study of Reproduction**. January, 2009. DOI:10.1095/biolreprod.108.073353.

MURPHY SP, TOMASI TB. Absence of MHC class II antigen expression in trophoblast cells results from a lack of class II transactivator (CIITA) gene expression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 1-12, 1998.

MUNSON, L.; WILHITE, A.; BOLTZ, V.F.; WILKINSON, J.E. Transforming Growth Factor β in Bovine Placentas. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 748-755, 1996.

NAIB,A.AL.; MAMO, S.; O’GORMAN, G.M.; LONERGAN, P.; SWALES, A.; FAIR, T. Regulation of non-classical major histocompatibility complex class I mRNA expression in bovine embryos. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 91, p. 31– 40, 2011.

OLIVEIRA, L.J., MCCLELLAN, S., HANSEN, P.J. Differentiation of the endometrial macrophage during pregnancy in the cow. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13213, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0013213.

OLIVER, R.A.; OCYUBRE, C.M.; MLLAR, I.P.; OAGMNR, A.L.G.; PSEOR, N.O.R.L. A genetic study of bovine lymphocyte antigens (BoLA) and their frequency in several breeds. **Immunogenetics**, v. 13, p. 127-132, 1981.

O'NEILL, C. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 56, p.229–237, 1997.

PARK, G.M.; LEE, S.; PARK, B.; KIM, E.; SHIN, J.; CHO, K.; AHN, K. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 606–611, 2004.

PENG, X.; ZHANG, S.; DENG, G.; LI, B.; WU, Y.; HE, M.; WANG, X.; LI, C.; QIU, C.; ZHANG, K. Differential expression of bovine leucocyte antigen class I chain-related gene 2 in pregnant dairy cows and neonatal calves. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 22, p. 2996-3001, 2011.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; MARK, R.; WALTER, M.R.; SHI, Y.; FISHER, P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 929-979, 2004.

POLANCZYK, M.J.; CARSON, B.D.; SUBRAMANIAN, S.; AFENTOULIS, M.; VANDENBARK, A.A.; ZIEGLER, S.F.; et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+regulatory T cell compartment. **The Journal of Immunology.**, v. 173, n. 4, p. 2227-30, 2004.

RAM, R.; CHANDRA, G. Macroscopic studies of the placenta of buffalos (*Bubalus bubalis*). **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 61, n. 8. P. 841-842, 1984.

REXROAD, C.E.; CASIDA, L.E.; TYLER, W.J.M. Crown-rump length of fetuses in purebred Holstein-Friesian cows. **Journal Dairy Science**, v. 57, p. 346-347 1974.

ROBB, L.; DIMITRIADIS, E.; LI, R.; SALAMONSEN, L.A. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines with key roles in implantation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 129–141, 2002.

ROBERTS RM. Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 18, p. 403-408, 2007.

ROBERTS, S.J. Veterinary obstetric and genital diseases. **Theriogenology**: Woodstock, 3 ed., 1986, 986p.

ROBERTSON, S.A. Seminal plasma and male factor signaling in the female reproductive tract. **Cell Tissue Res.**, 2005, 322: 43-52.

SAITO, S.; NAKASHIMA, A.; SHIMA, T.; ITO, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, p. 601-610, 2010.

SAKUMOTO, R.; MURAKAMI, S.; KISHI, H.; IGA, K.; OKANO, A.; OKUDA, K. Tumor Necrosis Factor- α and its receptor in the corpus luteum of pregnant cows. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 406–411, 2000.

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

SCHUBERTH, H.J. ;TAYLOR, U.; ZERBE, H.; WABERSKI, D.; HUNTER, R.; RATH, D. Immunological responses to semen in the female genital tract. **Theriogenology**, v. 70, p. 1174–1181, 2008.

SCHULZE-OSTHOFF K, BAKKER AC, VANHAESEBROECK B, BEYAERT R, JACOB WA, FIERIS W: Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 5317–5323, 1992.

SHORT, R.V. Species differences in reproductive mechanisms. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. Reproduction in mammals. **Cambridge University Press**: Grã Bretanha, 2 ed., livro 4, 1984, 380p.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, v. 64, p. 379-396, 2007.

SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G. Early embryonic mortality in the cows: its relationship with progesterone concentration. **Veterinary Record**, v. 112, p. 517-521, 1984.

STEPHENSON, F.H. Calculations for Molecular Biology and biotechnology – A guide to mathematics in the laboratory. **Elsevier**: San Diego, 2ed., 2010.

SUGAWARA, K.; KIZAKI, K.; HERATH, C.B.; HASEGAWA, Y.; HASHIZUME, K. Transforming growth factor beta family expression at the bovine feto-maternal interface. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 120, 2010.

TAKAHASHI, T.; KUNIYASU, Y.; TODA, M.; *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. **International Immunology**, v. 10, n. 12, p. 1969-1980, 1998.

TATO, C.M.; MARTINS, G.A.; HIGH, F.A.; DICIOCCIO, C.B.; REINER, S.L.; HUNTER, C.A. Innate production of IFN-gamma by NK cells is independent of epigenetic modification of the IFN-gamma promoter. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 1514-1517, 2004.

THATCHER, W.W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R. *et al.* Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1435-1450, 2001.

THIBODEAUX, J.K.; MYERS, M.W.; HANSEL, W. The beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor. **Theriogenology**, v. 43, p. 336, 1995.

TIZARD, I.R. Imunologia Veterinária – Uma Introdução. **Elsevier**: São Paulo, 8ed., 2009, 608p.

VAN DEN ELSEN, P.J.; VAN DER STOEP, N.; VIETOR, H.E.; WILSON, L.; VAN ZUTPHEN, M.; GOBIN, S.J. Lack of CIITA expression is central to the absence of antigen

presentation functions of trophoblast cells and is caused by methylation of the IFN-gamma inducible promoter (PIV) of CIITA. **Human Immunology**, v. 61, p. 850-862, 2000.

VONNAHME, K.A.; WILSON, M.E.; FORD, S.P. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. **Biology of Reproduction**: USA, v. 64, p. 1821-1825, 2001.

WHO. Biorisk management. Laboratory biosecurity guidance. **World Health Organization**, CDS/EPR/2006.6 September, 2006.
(http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2006_6.pdf)

WOODING, P.; BURTON, G. Comparative Placentation Structures, Functions and Evolution. **Springer**: United Kingdom, 2008, 304p.

YAMAGIWA, S.; GRAY, J.D.; HASHIMOTO, S.; *et al.* A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7282-7289, 2001.

YAO, Y.Q., BARLOW, D.H., SARGENT, I.L. Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 8379-8385, 2005.

ZENCLUSSEN, A.C.; GERLOF, K.; ZENCLUSSEN, M.L.; SOLLWEDEL, A.; BERTOJA, A.Z.; RITTER, T.; *et al.* Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺CD25⁺T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. **The American Journal of Pathology**, v. 166, n. 3, p. 811-22, 2005.

ZHENG, J.; VAGNONI, K.E.; BIRD, I.M.; MAGNESS, R.R. Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity, and angiotensin II type-1 receptors in the ovine placenta during the third trimester of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1189-1197, 1997.

ANEXO I: PARECER DO CEUA.

Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131/4335; e-mail: ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 053/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O
PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 012/09**

Projeto Pesquisa: " Expressão de MHC de classe 1 em placentas perfil de citocinas no útero durante a gestação em vacas".

Pesquisador Responsável: Dr. Marcelo Emílio Beletti

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 14 de julho de 2009.

Prof. Dr. José Roberto Mineo
Coordenadora do CEUA/UFU
pro - tempore

ANEXO II: MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

I.1. ANTIBIÓTICO

Diluir o sulfato de gentamicina (código) em solução fisiológica.

250 mg de sulfato de gentamicina em 5 mL de solução fisiológica

I.2. SOLUÇÃO DE PIRUVATO

A solução de piruvato dever ser feita todos os dias.

Pesar 0,0055 g de Piruvato sódico e diluir em 500 µL de água Milli Q.

I.3. PBS

Componentes	PBS Completo	PBS Ca ⁺² Mg ⁺² Free
Água Milli-Q	1 L	1 L
NaCl (137mM/171mM)	8 g	10 g
KCl (2,7mM/3,4mM)	0,2 g	0,25 g
Na ₂ HPO ₄ -Anidro (8mM)	1,15 g	-
Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O (4mM)	-	1,44 g
KH ₂ PO ₄ (1,5mM/1,8mM)	0,2 g	0,25 g
CaCl ₂ -2H ₂ O (0,7mM)	0,1 g	-
MgCl ₂ -6H ₂ O (0,5mM)	0,1 g	-
DL-Glucose (5,5mM)	1 g	-
Antibiótico	1 mL	-

Adicionar os elementos na ordem em que aparecem, sob agitação por quinze minutos, ajustar o pH para 7,2, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até um mês.

I.4. BASE TCM 199 HEPES

BASE TCM 199 Hepes	10 mL	50mL
Água Milli-Q	10 mL	50 mL
TCM 199	0,095 g	0,475 g
Bicarbonato de Sódio (5mM)	0,022 g	0,110 g
Hepes Ácido (10mM)	0,024 g	0,120 g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

I.5. MEIO DE LAVAGEM DE OVÓCITOS

Meio de Lavagem	10 mL	50 mL
BASE TCM 199 Hepes	9 mL	45 mL
SFB	1 mL	5 mL
Solução de Piruvato	20 µL	100 µL
Antibiótico	10 µL	50 µL

Preparar no dia do uso; filtrar em membrana de 0,22µm e colocar em estufa úmida com 5% CO₂, por uma hora para equilibrar.

I.6. BASE TCM 199 BICARBONATO

BASE TCM 199 Bicarbonato	10 mL	15 mL
Água Milli-Q	10 mL	15 mL
TCM 199	0,095 g	0,142 g
Bicarbonato de Sódio (26mM)	0,022 g	0,033 g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem. Preparar no dia do uso.

I.7. MEIO DE MATURAÇÃO DE OVÓCITOS

Meio de Maturação	10 mL	15 mL
Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	9 mL	13,5 mL
SFB	1 mL	1,5 mL
Solução de Piruvato	20 µL	30 µL
Antibiótico	10 µL	15 µL
FSH	100 µL	15 µL
LH	100 µL	150 µL

Adicionar os componentes na ordem, filtrar em membrana de 0,22µm, colocar na estufa para equilibrar por pelo menos 1 hora.

I.7.1. FSH (1µg/µL)

Componentes	31mL
TCM 199 Bicarbonato ou PBS Completo	31mL
Pluset [®] (500UI = 31,25mg de FSH)	500UI

Aliquotar em microtubo de 0,5mL, com 15µL cada, e armazenar em Freezer (−70°C), por até 6 meses.

I.7.2. LH (5µg/µL)

Componentes	2mL
TCM 199 Bicarbonato ou PBS Completo	2mL
Profasi [®] (2000UI = 0,01g de LH)	2000UI

Aliquotar em microtubo de 0,5mL, com 120µL cada, e armazenar em Freezer (−70°C), por até 6 meses.

I.8. BASES TALP-FERT e TALP-SPERM

Componentes	TL-Fert	TL-Sperm	TL-Fert	TL-Sperm
	25 mL		50 mL	
Água Milli-Q	25 mL	25 mL	50 mL	50 mL
NaCl (114mM/100mM)	0,166 g	0,145 g	0,333 g	0,291 g
KCl (3mM/3mM)	0,006 g	0,00575 g	0,012 g	0,0115 g
MgCl ₂ -6H ₂ O (0,5mM/0,4mM)	0,002 g	0,002 g	0,005 g	0,004 g
NaH ₂ PO ₄ -Anidro (0,3mM)	0,00117 g	0,0010 g	0,00235 g	0,0020 g
Bicarbonato de Sódio (25mM)	0,0525 g	0,0525 g	0,105 g	0,105 g
CaCl ₂ -2H ₂ O (2mM)	0,0075 g	0,0075 g	0,015 g	0,015 g
DL-Ácido Lático (60%) (12mM/26mM)	35,7 µL	77,5 µL	71,5 µL	155 µL
Phenol Red (30µM)	0,0003 g	0,0003 g	0,0005 g	0,0005 g
Hepes Ácido (10mM)	-	0,0595 g	-	0,119 g

Ajustar o pH para 7,4 com gás (5% de CO₂) durante 1 minuto. Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

I.9. SOLUÇÃO DE PERCOLL 90% (Capacitação espermática)

Componentes	1 touro	2 touros	3 touros	4 touros
Percoll	1,8 mL	3,6 mL	5,4 mL	7,2 mL
Solução 10X	200 µL	400 µL	600 µL	800 µL
Estoque CaCl ₂ (1M)	4 µL	8 µL	12 µL	16 µL
Estoque MgCl ₂ (100mM)	7,8 µL	15,6 µL	23,4 µL	31,2 µL
DL-Ácido Lático (60%) (26,4mM)	7,4 µL	14,8 µL	22,2 µL	29,6 µL
Bicarbonato de Sódio (20mM)	0,0042 g	0,0084 g	0,0126 g	0,0168 g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, sob agitação constante, e homogeneizar bem antes de adicionar o bicarbonato, pois o ácido láctico fica depositado no fundo do frasco.

I.9.1. Solução 10X para Percoll

Componentes	5 mL	10 mL
Água Milli-Q	5 mL	10 mL
Estoque KCl (1M) (31mM)	0,1545 mL	0,309 mL
Estoque NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (100mM) (3mM)	0,146 mL	0,292 mL
NaCl (800mM)	0,233 g	0,4675 g
Hepes Ácido (50mM)	0,060 g	0,119 g
Hepes Sódico (50mM)	0,065 g	0,130 g

Adicionar os elementos na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm, aliquotar em microtubo de 0,5mL, com 210µL cada, e armazenar em Freezer (–70 °C), por até 6 meses.

I.9.1.1. Estoque KCl (1M)

Componentes	1 mL	5 mL
Água Milli-Q	1 mL	5 mL
KCl	0,0745 g	0,373 g

I.9.1.2. Estoque NaH₂PO₄-H₂O (100mM)

Componentes	1 mL	5 mL
Água Milli-Q	1 mL	5 mL
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	0,0138 g	0,069 g

I.9.2. Estoque CaCl₂ (1M)

Componentes	10 mL
Água Milli-Q	10 mL
CaCl ₂ -2H ₂ O (1M)	1,47 g

Filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em Geladeira (4°C).

I.9.3. Estoque MgCl₂ (100mM)

Componentes	10 mL
Água Milli-Q	10 mL
MgCl ₂ ·6H ₂ O (100mM)	0,203 g

Filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C).

I.10. TALP-SPERM PARA PROCESSAMENTO DO SÊMEN

Componentes	1 touro	2 touros	3 touros	4 touros
BASE TALP-SPERM	4,96 mL	9,93 mL	14,89 mL	19,86 mL
Solução de Piruvato	10 µL	20 µL	30 µL	40 µL
Antibiótico	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL

Adicionar os componentes e filtrar em membrana de 0,22µm e colocar na estufa úmida de CO₂ para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

I.11. Meio de fecundação – Meio Talp-Fert

Componentes	2 touros	4 touros	6 touros
Base TALP-FERT	3,6 mL	7,2 mL	10,8 mL
Antibiótico	4 µL	8 µL	11 µL
Solução de Piruvato	8 µL	16 µL	24 µL
PHE	160 µL	320 µL	480 µL
Heparina	40 µL	80 µL	120 µL
BSA (FIV) (6mg/mL)	0,024 g	0,048 g	0,072 g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e deixar na estufa úmida de CO₂ com a tampa do frasco frouxa, para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

I.11.1. PHE

Solução pH 4,0	50 mL
Água Milli-Q	50 mL
DL-Ácido Lático (60%) (29,4mM)	0,165 g (pesar o líquido)
Bisulfito de Sódio	0,050 g

Soluções Mãe	Penicilamina	Hipotaurina	Epinefrina
Salina 0,9%	10 mL	10 mL	-
D-Penicilamina (2mM)	0,003 g	-	-
Hipotaurina (1mM)	-	0,0011 g	-
Solução pH 4,0	-	-	40 mL
Epinefrina (245µM)	-	-	0,0018 g

PHE final	11 mL
D-Penicilamina	2,5 mL
Hipotaurina	2,5 mL
Epinefrina	2 mL
Salina 0,9%	4 mL

Aliquotar em microtubos de 0,5mL com 250µL cada, envoltos por papel alumínio, e armazenar em Freezer (-70°C), por até 6 meses.

I.11.2. Heparina

Componentes	500 µL	1mL
BASE TALP-FERT	500 µL	1 mL
Heparina	6 µL	12 µL

Armazenar em geladeira (4°C), em microtubo de 1,5mL revestido por papel alumínio, por até um dia.

I.12. BASE SOF

Soluções Estoque	A Solução de Sais	B Solução de Bicarbonato	D Solução de CaCl ₂	L- Glutamina
Água Milli-Q	9,84 mL	10 mL	1 mL	1 mL
NaCl (1,1M)	0,629 g	-	-	-
KCl (72mM)	0,0534 g	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (12mM)	0,0162 g	-	-	-
MgSO ₄ -7H ₂ O (7,4mM)	0,0182 g	-	-	-
DL-Ácido Lático (60%) (50µM)	60 µL	-	-	-
Bicarbonato de Sódio (250mM)	-	0,210 g	-	-
<i>Phenol Red</i> (260µM)	-	0,001 g	-	-
CaCl ₂ -2H ₂ O (178mM)	-	-	0,0262 g	-
L-Glutamina (200mM)	-	-	-	0,02923 g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e armazenar em geladeira (4°C). Os estoques A, B, D e L-Glutamina devem ser preparados semanalmente.

BASE SOF	20 mL	40mL
Água Milli-Q	15,6 mL	31,2 mL
Estoque A	2 mL	4 mL
Estoque B	2 mL	4 mL
Estoque D	200 µL	400 µL
L-Glutamina	20 µL	40 µL
BME Essenciais (50X)	200 µL	400 µL
MEM Não-Essenciais (100X)	200 µL	400 µL
Myo-Inositol (2,8mM)	0,01 g	0,02 g
Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado (340µM)	0,002 g	0,004 g

Adicionar os componentes na ordem e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

I.13. MEIO DE CULTIVO IN VITRO (SOF FINAL)

SOF final	1 mL	5 mL	6 mL	10 mL
BASE SOF	968 µL	4,84 mL	5,81 mL	9,68 mL
Solução de piruvato	2 µL	10 µL	12 µL	20 µL
Antibiótico	5 µL	25 µL	30 µL	50 µL
BSA (CIV) (5mg/mL) ou	0,005 g	0,025 g	0,030 g	0,05 g
(6mg/mL)	0,006 g	0,03 g	0,036 g	0,06 g
SFB	25 µL	125 µL	150 µL	250 µL

Adicionar o BSA por último, esperar dissolver, filtrar em membrana de 0,22µm e colocar na estufa úmida de CO₂ para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

I.14. MEIO PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (H-SOF)

Estoque E - Solução de Hepes	1 mL	5 mL	10 mL
Água Milli-Q	1 mL	5 mL	10 mL
Hepes Sódico (125mM)	0,0325 g	0,162 g	0,325 g
Hepes Ácido (125mM)	0,0298 g	0,149 g	0,298 g
<i>Phenol Red</i> (260µM)	0,0001 g	0,0005 g	0,001 g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana, ou em Freezer (-70°C), por até um mês.

BASE H-SOF	5 mL	10 mL	50 mL
Água Milli-Q	3,9 mL	7,8 mL	39 mL
Estoque A	0,5 mL	1 mL	5 mL
Estoque B	100 µL	200 µL	500 µL
Estoque D	50 µL	100 µL	500 µL
Estoque E	400 µL	800 µL	4 mL
L-Glutamina	5 µL	10 µL	50 µL
BME Essenciais (50X)	50 µL	100 µL	500 µL
MEM Não-Essenciais (100X)	50 µL	100 µL	500 µL
Myo-Inositol (2,8mM)	0,0025 g	0,005 g	0,025 g
Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado (340µM)	0,0005 g	0,001 g	0,005 g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

I.14.1. Meio H-SOF final (H-SOF estoque + 2,5% de SFB+ 5mg BSA/mL):

H SOF final	1 mL	5 mL	50 mL
BASE H-SOF	1 mL	5 mL	50 mL
Solução de Piruvato	2 µL	10 µL	100 µL
Antibiótico	1 µL	5 µL	50 µL
BSA (CIV) (5mg/mL)	0,005 g	0,025 g	0,25 g
SFB	25 µL	125 µL	1,25 mL