



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL DE
CLASSE I NÃO CLÁSSICO NA PLACENTA BUBALINA**

GABRIEL XAVIER SILVA

São Luís – MA

2016

GABRIEL XAVIER SILVA

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL DE
CLASSE I NÃO CLÁSSICO NA PLACENTA BUBALINA**

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

Curso: Mestrado em Ciência Animal.

Área de Concentração: Concentração de
Patogênese, epidemiologia e controle de doenças
dos animais.

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

São Luís – MA

2016

Silva, Gabriel Xavier

Expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I não clássico na placenta bubalina / Gabriel Xavier Silva– São Luís, 2016.

57 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Alcina Vieira de Carvalho Neta

1.MHC-Ib. 2.Celula trofoblastica. 3. BuLA.I.Título

CDU:636.293.1:636.082.455(812.1)

GABRIEL XAVIER SILVA

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL DE
CLASSE I NÃO CLÁSSICO NA PLACENTA BUBALINA**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual do Maranhão, para obtenção do título
de Mestre

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta, Dsc - UEMA
(Orientadora)

Prof. Dr. José de Ribamar Souza Torres Júnior, Dsc - UFMA
1º membro

Profa. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva, Dsc - UFT
2º membro

Dedico este trabalho ao Deus Criador...

Aos maiores incentivadores de minha formação acadêmica: minhas amadas tias Ana e Bárbara; e meus pais José Maria, Francisca e João Batista.

À minha linda namorada, Mary, pela apoio constante e compreensão durante todo esse tempo.

Com eterna gratidão, ofereço este trabalho!

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço à Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva pela colaboração e apoio para realização do presente trabalho. Ao Prof. Dr. José de Ribamar Souza Torres Júnior pelo auxílio nas análises estatísticas.

À doutoranda Larissa Samernto pelo auxílio na execução da parte laboratorial e elaboração dos gráfico/tabelas. À mestranda Daniele Rosa pelo suporte prestado. Aos graduandos: Taynan Rosa, Wayllba Barcelos, Rayule Cristina, Ellainy e Marcus pela ajuda nas coletas e processamento das amostras. À todos do Grupo Pesquisa em Patologia Molecular.

Agradeço ao grupo do Laboratório de Anatomopatologia, nas pessoas do Prof. Dr. Fábio Henrique e da mestranda Renata Mondêgo pela atenção e pelos materiais cedidos para realização das coletas.

Ao grupo GEPRD nas pessoas do mestrando Emerson Oliveira e da graduanda Thays Bastos, pela parceria nas viagens realizadas à baixada maranhense.

À Jucimary Braga, pelo apoio e ajuda na revisão e normatização da dissertação.

Ao FRIGOSOUSA e aos proprietários dos frigoríficos, por gentilmente permitirem a coleta dos materiais, fundamentais para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), instituição na qual graduei-me e pude ampliar minhas experiências científicas através do Programa de Pós-graduação Stricto sensu, por ela oferecido.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) pelo fomento do trabalho.

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

“Ainda que as figueiras não produzam frutas, e as parreiras não deem uvas; ainda que não haja azeitonas para apanhar nem trigo para colher; ainda que não haja mais ovelhas nos campos nem gado nos currais, mesmo assim eu darei graças ao Senhor e louvarei a Deus, o meu Salvador. O Senhor Deus é a minha força. Ele torna o meu andar firme como o de uma corça e me leva para as montanhas, onde estarei seguro.”

(Habacuque 3:17-19)

RESUMO

Apesar da bubalinocultura ser uma fonte alternativa de produção de alimentos, os criadores de búfalos enfrentam dificuldades nos termos de baixa eficiência reprodutiva, infertilidade/subfertilidade, nascimento de bezerros fracos. Sabe-se que a imunidade durante o período gestacional em eutérios desempenha um papel importantíssimo na manutenção e viabilidade do concepto. Acredita-se que o Complexo de histocompatibilidade principal classe I não clássico (MHC-I) tem função importante na tolerância materno-fetal, e na resposta autoimune fetal; todavia não há estudos relatando a cinética da expressão do MHC-Ia de fêmeas bubalinas prenhes. Objetivou-se avaliar a expressão gênica de MHC de classe I não clássico em placenta bubalina em diferentes estágios de gestação. Foram coletados fragmentos de placentas (placentônio e córion) de 15 vacas bubalinas em diferentes estágios gestacionais (cinco de cada trimestre de gestação), as amostras foram acondicionadas em RNAlater. Realizou-se a extração de RNA usando e logo em seguida a síntese de cDNA. O qRT-PCR foi realizado utilizando-se pares de iniciadores descritos para bovinos para os genes de MHC-Ib (NC3 e MICB). Os dados foram analisados utilizando o método Ct comparativo. Os iniciadores desenhados para bovinos foram capazes de amplificar cDNA sintetizados a partir de RNA bubalino, indicando certa homologia entre os genes de MHC-Ib bovino e bubalinos, também demonstrando que possivelmente há uma imunomodulação no útero gravídico em búfalos. Os níveis de expressão de MHC-Ib (NC3 e MICB) em diferentes regiões da placenta bubalina variaram de acordo com terço gestacional, demonstrando que provavelmente a resposta imunológica varia na placenta bubalina.

Palavras-chave: MHC-Ib, célula trofoblástica, BuLA, qRT-PCR

ABSTRACT

Despite the buffalo being an alternative source of food production, buffalo farmers face difficulties under low reproductive efficiency, infertility/subfertility, and birth of weak calves. It is known that immunity during pregnancy in mammals plays an important role in the maintenance and viability of the fetus. It is believed that the non-classical Major Histocompatibility Complex class I (MHC-I) influences the maternal-fetal tolerance, and fetal autoimmune response; however, there are no studies reporting the *MHC-Ia* expression kinetics in pregnant female buffalo. This study aimed to evaluate the non-classical MHC class I genes (NC3 and MICB) expression in buffalo placenta at different stages of pregnancy. Placenta fragments were collected (placenta and chorion) from 15 buffalo cows at different gestational stages (five of each trimester), the samples were stored in RNAlater. RNA extraction was performed using RNeasy spin columns and Placenta cDNA synthesis. The qRT-PCR was performed using primers for bovines to detect MHC-Ib (MICB and NC3) expression. The data were analyzed using the comparative Ct method. The primers designed for cattle were able to amplify cDNA synthesized from RNA of buffalo, indicating a certain homology between MHC-Ib genes in cattle and buffaloes, possibly also demonstrating that there is immunomodulation of the gravid uterus in buffaloes. The levels of expression of MHC-Ib (NC3 and MICB) in different regions (chorion and cotyledon) of buffalo placenta varied, demonstrating that probably the immune response varies in the buffalo placenta.

Palavras-chave: MHC-Ib, trophoblastic cells, BuLA, qRT-PCR

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Lista de genes e iniciadores utilizados no qRT-PCR..... | 36 |
| Figura 1 - Representação esquemática da placenta zonaria do tipo cotiledonária, evidenciando a migração de células binucleadas e a formação de célula híbridas..... | 25 |
| Figura 2 - Representação esquemática do Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe II (B) e Classe II (A) | 27 |
| Figura 3 - Representação esquemática comparando a organização genética do MHC bubalino (BuLA) no cromossomo 2 do <i>Bubalus bubalis</i> com MHC bovino (BoLA). (STAFUZZA et al, 2012) | 28 |
| Figura 4 - Gráfico da expressão de MICB na placenta de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a”, “b” e “c” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais (p<0.05) | 40 |
| Figura 5: Gráfico da expressão de MICB na região coriônica de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a” e “b” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais (p<0.05) | 41 |

Figura 6: Gráfico da expressão de MICB no placentônio de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a” e “b” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$)
.....42

Figura 7: Gráfico da expressão de NC3 na placenta de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a”, “b” e “c” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$)
..... 43

Figura 8: Gráfico da expressão de NC3 região coriônica de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a” e “b” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$)
..... 44

Figura 9: Gráfico da expressão de NC3 região coriônica de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a” e “b” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$)
..... 45

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|--------|--|
| BoLA | Antígeno Leucocitário Bovino |
| BPV-4 | Papilomavírus Bovino 4 |
| BuLA | Antígeno Leucocitário Bupalino |
| cDNA | DNA complementar |
| DC | Células Dendríticas |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ER | Reticulo Endoplasmático |
| HLA | Antígeno Leucocitário Humano |
| iNKT | Células NK T invariantes |
| MHC | Complexo de Histocompatibilidade Principal |
| MHC-I | Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I |
| MHC-I | Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I não clássico |
| MHC-Ia | Complexo de Histocompatibilidade Principal classe I clássico |
| MHC-II | Complexo de Histocompatibilidade Principal classe II |
| MIC | MHC classe I em cadeia relacionada |
| MICA | MHC classe I em cadeia relacionada sequencia A |

MICB MHC classe I em cadeia relacionada sequencia B

mRNA RNA mensageiro

NK *Natural Killer*

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

qRT-PCR PCR quantitativa pós transcrição reversa

RNA Ácido Ribonucleico

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| LISTA DE TABELAS E FIGURAS | 11 |
| LISTA DE TABELAS E FIGURAS | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 Importância da bubalinocultura | 20 |
| 2.2 Período reprodutivo em Búfalas..... | 22 |
| 2.3 Imunidade na Gestação | 23 |
| 2.4 Estrutura do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) | 26 |
| 2.5 Proteínas do MHC-I Clássicas (MHC-Ia) e não clássicas (MHC-Ib) | 29 |
| 2.6 MHC Classe I na Gestação | 30 |
| 3 OBJETIVOS..... | 33 |
| 3.1 Geral..... | 33 |
| 3.2 Específicos..... | 33 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| 4.1. Expressão MHC I não clássico na placenta bovina | 34 |
| 4.1.1 Coletas de amostras..... | 34 |
| 4.1.2 Extração de RNA..... | 34 |
| 4.1.3 Síntese de cDNA | 35 |
| 4.1.4 PCR quantitativa pós transcrição reversa (qRT-PCR) | 35 |

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 4.2 Análise estatística | 36 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 7. CONCLUSÕES | 47 |
| REFERÊNCIAS | 48 |

1 INTRODUÇÃO

A comunicação adequada entre mãe e feto é fundamental para o sucesso da gestação e ocorre por meio da placenta na maioria dos eutérios. A tolerância ao feto provavelmente envolve tanto a falta de expressão de antígenos polimórficos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) nas células trofoblásticas da placenta, quanto a manutenção de um estado de repouso imunológico ou imunossupressor no útero (HUNT et al,2005).

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

Existem dois tipos de genes de MHC de classe I, clássico e não clássico. As moléculas clássicas são expressas na maioria das células somáticas e apresentam peptídeos derivados do próprio animal ou de proteínas de patógenos intracelulares para linfócitos T citotóxicos (LOW et al., 1990; GOGOLIN-EWENS et al., 1989; HUNT et al., 1987).

Genes de classe I do MHC não clássicos parecem ter papéis únicos, mas cruciais, especialmente em relação aos mecanismos de evasão de patógenos, controle de ativação de células NK e reprodução bem-sucedida (ISHITANI et al., 2003; WANG et al., 2002). Em humanos, por exemplo, HLA-E, F e G constituem a classe de genes não clássicos (WEI; ORR, 1990). As características destes genes heterogêneos variam, mas incluem: expressão não ubíqua, polimorfismo reduzido ou nulo e cadeias pesadas codificadas com domínios citoplasmáticos truncados.

Em alguns casos, os padrões de expressão e funções não foram bem definidos, por exemplo, HLA-F (ISHITANI et al., 2003). Em outros, como a HLA-E e QA-1b (camundongos), a função é razoavelmente bem compreendida; tal como inibir a resposta de células NK CD94/NKG2C evitando a lise celular, e também, evitar o reconhecimento e resposta por células T CD8⁺ (VANCE et al., 2002; BRAUD et al., 1998). Entretanto, em outras espécies, pouco se sabe sobre os genes de MHC classe I não clássica.

Em bovinos, o MHC é conhecido como o antígeno leucocitário bovino (BoLA). A existência e localização genômica no cromossomo 23 de quatro genes de MHC de classe Ib bovinos (NC1-NC4) (BIRCH et al., 2008; DAVIES et al., 2006). Além disso, foi descrito um gene *MIC* que está posicionado próximo aos três genes de MHC de classe I não clássicos já descritos, NC2, NC3 e NC4 (BIRCH et al. 2008).

Os genes de *MHC* de búfalos (*BuLA*) foram mapeados no cromossomo 2p com bandas de homologia no cromossomo 23 no bovino. (IANNUZZI et al., 1993). Em comparação com outras espécies de ruminantes, o *loci* de MHC é pouco caracterizado. A organização do complexo BuLA foi determinada principalmente por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (DI MEO et al., 2008; IANNUZZI et al., 1993, 2003), atribuindo a cada marcador de bandas cromossômicas específicas. Em bubalinos, estudos têm se centrado quase que exclusivamente em genes de MHC de classe II (*loci* DRA, DRB e DQ), distribuídos em dois grupos de ligação correspondentes a agrupamentos genéticos da classe IIa e IIb em bovinos (NIRANJAN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2008; SENA et al., 2003; DE et al., 2002).

O estudo de MHC em bubalinos baseia-se principalmente na a localização e polimorfismo dos genes na caracterização molecular do MHC-II (NASKAR et al, 2012; DE et al, 2002; SENA et al, 2003) Estudos relatando atuação do MHC-I na imunidade dessa espécie são escassos. Devido as notórias dificuldades reprodutivas da espécie bubalina em criações tecnificadas (MOAEEN-UD-DIN, 2014; VALE & RIBEIRO, 2005; CAMPANILE, 2005),

intui-se que genes de MHC-Ib influenciam fortemente na manutenção da prenhez. Como já citado, os MHC-Ib são oligomórficos e conservados entre as espécies. Alguns trabalhos descrevem tal complexo na espécie bovina, dentre os genes estudados desse complexo destacam-se o MICB e o NC3 (SANTOS et al, 2015; SHU et al, 2012). Devido à proximidade genética entre as duas espécies, acredita-se que os genes de MHC-Ib se mantem homólogos entre bovinos e bubalinos, porém variam em seu padrão de expressão durante a prenhez em bubalinos, o que pode influenciar na manutenção da gestação nesta espécie e ter participação nos mecanismos de defesa deste tecido na búfala. Essa intrigante homologia incita a realização de estudos em moléculas do sistema imunológico, que no organismo do búfalo confere tanta resistência a doenças, especialmente do trato reprodutivo, alvo do nosso estudo neste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da bubalinocultura

No cenário atual, a pecuária tem buscado estratégias visando à produção de proteína animal a baixo custo e de alta qualidade, de forma que a bubalinocultura tem ganhado impulso como fonte alternativa da bovinocultura (RANJHAN, 2012; MIHAIU et al., 2010).

Dentre as características vantajosas da produção de búfalos, destaca-se que carne bubalina possui baixos índices de gordura e uma quantidade satisfatória de proteína. Já o leite de búfala possui uma concentração média de 8% a 10% de gordura; bem como ótimos teores de proteínas e minerais (FIGUEIREDO, et al 2010; RODRIGUES et al, 2008). Outro ponto importante que deve ser ressaltado é sem dúvida, as características zootécnicas da referida espécie animal, como docilidade, rusticidade, precocidade e longevidade juntamente com sua grande capacidade de adaptabilidade (VIEIRA, 2011).

Há duas espécies principais de búfalos no mundo: o búfalo Asiático (*Bubalus bubalus*) e o búfalo Africano (*Syncerus caffer*). A domesticação do búfalo asiático inicialmente deu-se a partir de dois pontos, na Índia em 3000 a.C e na China em 5000 a.C (MOAEEN-UD-DIN et al, 2014). Na espécie asiática há duas variações: búfalo da água (ou denominado búfalo do rio), que possui 25 pares de cromossomos (50N); e o búfalo do pântano, que possui 24 pares de cromossomos (48N). Um fato interessante é que as duas subespécies podem cruzar, e apesar da diferença entre o número de cromossomos, gerar híbridos férteis de 49N.

Essa espécie de búfalos vem ganhando destaque na pecuária no mundo, caracterizando-se pela sua excelente adaptação às pastagens grosseiras de campos e vargens, juntamente com sua capacidade de produzir tendo como outro aspecto importante o seu destaque na produção de alimentos em regiões com características consideradas insatisfatórias à produção de bovinos (MANO FILHO, 1987).

No Brasil a espécie chegou há pouco mais de um século na região Norte, mais precisamente na Ilha de Marajó, no estado do Pará, onde demonstrou boa adaptação à microclimas e formas de manejos variados quanto ao sistema extensivo em áreas alagadas o que contribuiu para sua rápida multiplicação (ANDRADE; GARCIA, 2005), região que apresenta temperaturas acima de 30°C e umidade relativa do ar em torno de 75 a 80%, condições estas exigida para adaptabilidade da referida espécie.

Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, o Brasil possui cerca de 2 milhões de cabeças de búfalos, sendo rebanhos constituídos de búfalos do rio (das raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi) e de rebanhos de búfalos do pântano (da raça Carabao). O Maranhão possui cerca de 80.212 cabeças de bubalinos, sendo o quinto maior rebanho brasileiro e primeiro na região Nordeste (IBGE, 2015).

A inserção do bubalino no Maranhão deu-se ao final da década de 50, a partir de uma iniciativa desenvolvimentista. O governo do Maranhão passou a incentivar a importação de bubalinos para o estado, desta forma, estes foram introduzidos nos campos inundáveis da baixada maranhense disseminando-se entre as regionais de Viana e Pinheiro. A região se caracteriza por lagoas de água doce no período de estiagem e campos alagados no período chuvoso, condições estas ideais a criação dos búfalos, e semelhante àquela da Ilha de Marajó, de onde os búfalos procediam (MUNIZ, 2007).

Apesar da reconhecida rusticidade dos bubalinos frente às condições ambientais adversas para a criação de bovinos, os búfalos são suscetíveis à grande parte das doenças infecciosas que acometem os bovinos. Dessa maneira, o conhecimento das diferenças entre as duas espécies no que diz respeito à suscetibilidade, epidemiologia, desenvolvimento da resposta imune, manifestações clínicas, especificidade dos testes de diagnóstico e tratamento de doenças como brucelose, mastite, febre aftosa, dentre outras, mostra-se de extrema importância para o

desenvolvimento de um manejo sanitário específico para bubalinos (LEITE; BASTIANETTO, 2009).

2.2 Período reprodutivo em Búfalas

Apesar das vantagens produtivas e adaptativas dos bubalino, os criadores de búfalo enfrentam dificuldades nos termos de baixa eficiência reprodutiva, produção quantitativa abaixo do ideal, infertilidade/subfertilidade e nascimento de bezerros fracos (MOAEEN-UD-DIN, 2014; VALE; RIBEIRO, 2005). Tais problemas reprodutivos podem estar associados a doenças infectocontagiosas, ou mesmo distúrbios de origem congênita. Os distúrbios de origem congênita comumente são advindos da consanguinidade nos rebanhos bubalinos (OHASHI et al, 2012). Ressalta-se também que os búfalos são suscetíveis à grande parte das doenças infecciosas que acometem o trato reprodutivo em bovinos. O conhecimento acerca da suscetibilidade, epidemiologia, desenvolvimento da resposta imune e manifestações clínicas, mostra-se de extrema importância para o desenvolvimento de um manejo sanitário e reprodutivo específico para bubalinos (YSUF et al 2013).

Estudos que relatam dados sobre a imunidade materna de fêmeas bubalinas ainda são bem escassos e apresentam resultados preliminares. Sabe-se que a imunidade durante o período gestacional em mamíferos desempenha um papel importantíssimo na manutenção e viabilidade do conceito. Nota-se nessa espécie o alto índice de mortalidade embrionária, cerca de 40 a 50%, tanto na fase de desenvolvimento do embrião como nas demais fases de gestação (CAMPANILE et al, 2004). Nesse período a imunidade materna deve ser seletiva aos patógenos e ao mesmo tempo tolerante ao tecido embrionário. Muitos estudos ainda são necessários para o entendimento dos mecanismos da imunidade materno fetal em bubalinos.

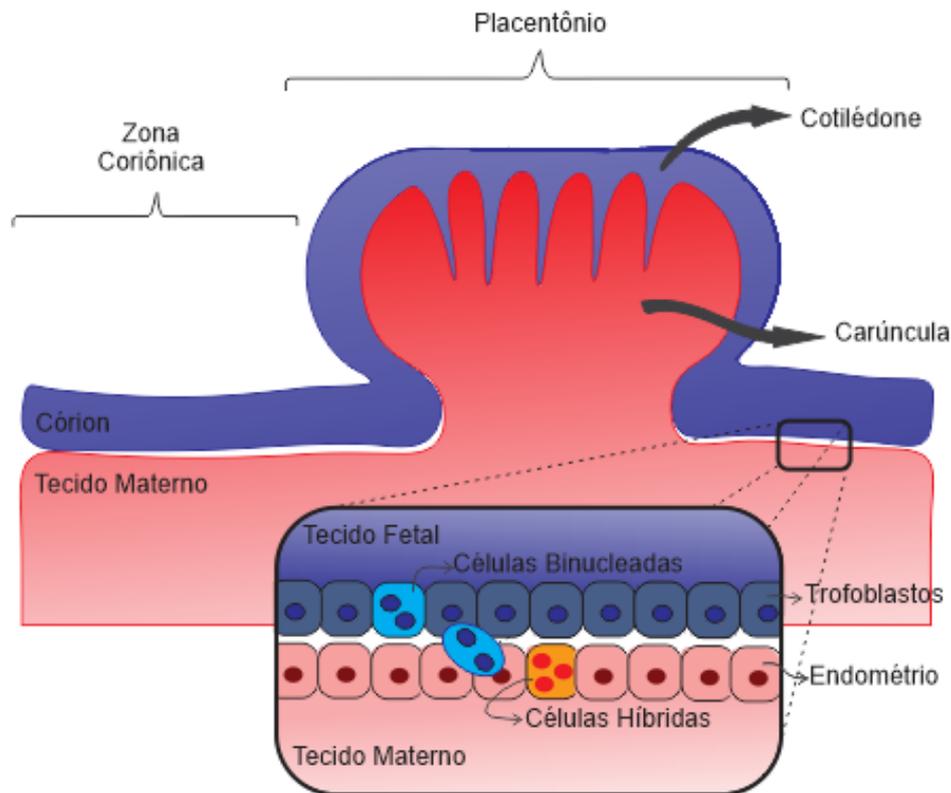
2.3 Imunidade na Gestação

O embrião é considerado um enxerto semi-alogênico, pois possui 50% de material genético paterno, o que o caracteriza como estranho ao organismo materno (HUNT et al, 2005). Por isso é necessário a existência de mecanismos específicos para modular e moderar o sistema imune materno, impedindo que as fêmeas rejeitem os fetos. Hoje determinados aspectos desses mecanismos de tolerância ao conceito foram identificados, tais como: as circulações de sangue do feto e da mãe estão totalmente separadas; no feto, antígenos transplantários aparecem tardiamente; tolerância e imunomodulação materno-fetal (LYNGE et al, 2014; BAINBRIDGE et al, 2000). Adicionalmente, alterações nestes mecanismos podem levar a complicações durante o período gestacional.

Apesar dos mecanismos de tolerância serem bem descritos em humanos, ratos e camundongos é necessária cautela ao extrapolar alguns dados para ruminantes, pois existem diferenças significativas entre as espécies (BENEDICTUS et al, 2015; BAINBRIDGE, 2000). Dentre as diferenças, podemos destacar inicialmente que o tipo de placentação em ruminantes é zonaria do tipo cotiledonária. Tanto bovinos quanto em búfalos, o trofoblasto fetal e endométrio materno formam um revestimento epitelial contínuo ao longo de toda a placenta. Estruturas especializadas chamadas placentônios formam-se através de interdigitatação do epitélio materno (carúncula) com tecido fetal (cotilédone), aumentando assim localmente a área de superfície para a troca de resíduos e nutrientes (Figura 1) (SCHLAFER et al., 2000). Quando observado a histologia da placenta em ruminantes há um forte contraste com a placenta humana, em que o trofoblasto fetal estão diretamente em contato com o sangue materno, pois os trofoblastos extravilosos invadem o tecido uterino e remodelam os vasos sanguíneos maternos (GUDE et al., 2004). A anatomia da placenta bubalina garante o contato mínimo entre o sistema imune materno e células fetais.

Nos grandes ruminantes domésticos a mortalidade embrionária varia de 35% a 50% em fêmeas saudáveis inseminadas artificialmente. Estima-se que 70-80% do total de perda embrionária ocorre entre os dias 8 e 16 após a gestação (período correspondente ao reconhecimento materno da gestação). Indicando que possivelmente o sistema imunitário possui forte influência na prenhez de ruminantes (NAIB, 2011). Durante a gestação a imunidade materna é notoriamente ativa, e sob certas condições pode contribuir para danos e/ou morte fetal. O padrão de citocinas entre o feto e o útero deve sempre estar precisamente equilibrado, certos distúrbios durante a gestação já são bem descritos em humanos, tais como: a destruição dos eritrócitos fetais (antígeno Rh, eritroblastose) e das plaquetas (HPA-1 e -2, trombocitopenia aloimune) por anticorpos maternos e processos infecciosos. (ARLETTAZ et al, 2004; HUNT et al, 2005; PIETRA et al, 2009).

Figura 1 - Representação esquemática da placenta zonaria do tipo cotiledonária, evidenciando a migração de células binucleadas e a formação de célula híbridas.



No entanto, sabe-se que o organismo materno mais tolera do que rejeita a disparidade gênica que há no feto. Em condições normais (fora do útero gravídico) esperar-se-ia uma resposta mediada por linfócitos T citotóxicos (CD8+) ou células *natural killer* (CD94) que levariam a morte do conceito devido a expressão de Complexos de Histocompatibilidade (MHC) de origem paterna. (PIETRA et al, 2009; HUNT et al, 2005; ARLETTAZ et al, 2004).

Estudos relatam que alguns *loci* de *MHC* expressos de origem paterna no útero geram mais uma resposta tolerogênica que antigênica. Mesmo que outros *loci* do *MHC* gerem uma resposta adaptativa, mediada por imunoglobulinas, contra o enxerto semialográfico, os anticorpos comumente são ineficientes para causar danos às células trofoblásticas (HUNT et al,

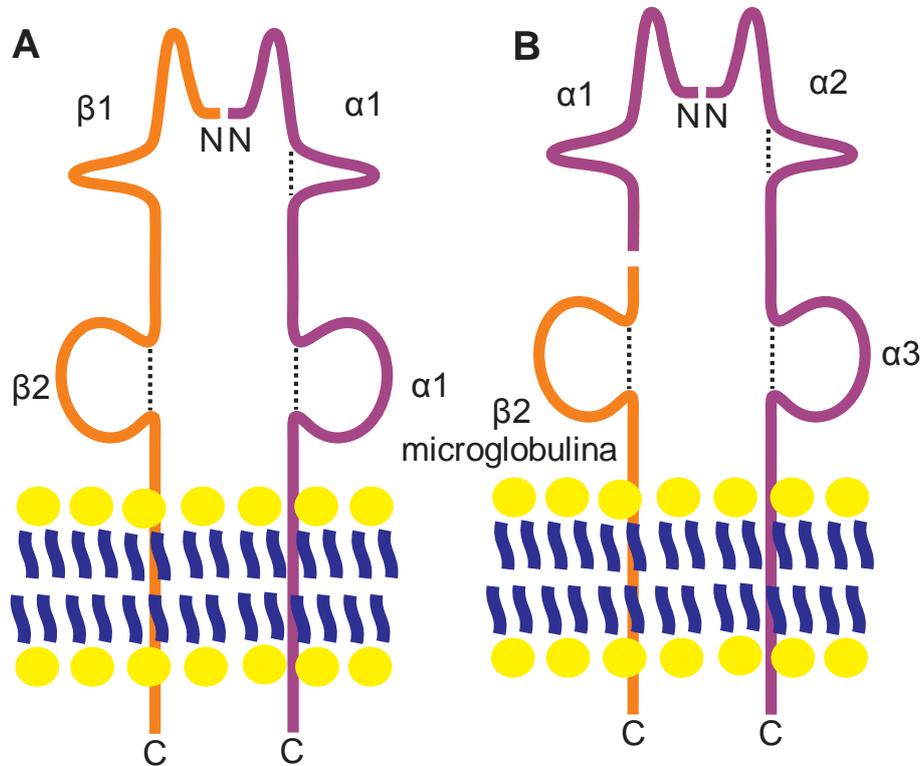
2006; HUNT et al, 2005). De tal forma que a resposta materna é imunossuprimida e modulada no microambiente uterino, criando um sítio privilegiado no útero.

2.4 Estrutura do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC)

Os genes do complexo de histocompatibilidade, que codificam aloantígenos extremamente potentes na estimulação à rejeição de tecidos transplantados, foram primeiramente descobertos em camundongos (KLEIN, 1975). Tal descoberta levou à identificação de um *loci* de codificação em humanos e camundongos (KLEIN, 1979; KLEIN, 1978; SVEJGAARD et al., 1975). O MHC humano, conhecido como complexo antígeno leucocitário humano (HLA), e do camundongo, o complexo H-2, estão localizados nos cromossomos 6 e 17, respectivamente. Nos bubalinos, sabe-se que o gene do antígeno leucocitário bubalino (BuLA) se encontra no braço curto do cromossomo 2 que é homólogo ao cromossomo 23 em bovinos (STAFUZZA et al, 2012; BIRCH et al, 2008).

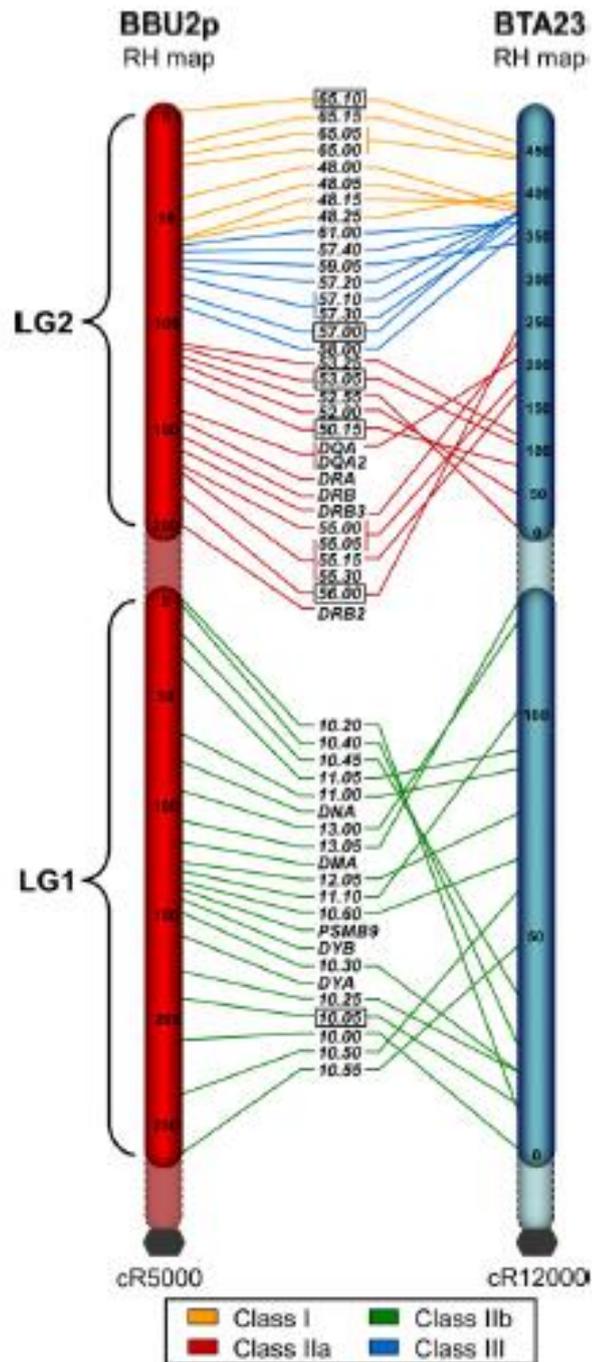
Existem duas classes de glicoproteínas de MHC: MHC-I e MHC-II. Proteínas da classe I compreendem uma cadeia de polipeptídeo alfa (α), uma subunidade não-covalente de 44 kD de peso molecular, que é ligada a uma cadeia de 12 kD chamado β_2 microglobulina (β_2m) que contribui para formar uma proteína estável de superfície celular presente na maioria das células nucleadas (Figura 2). As proteínas de MHC-II são heterodímeros compostos por uma cadeia polipeptídica alfa (α) e beta (β). As moléculas de classe II são expressas nas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), tais como células dendríticas (DC), macrófagos e células B, entretanto, não são expressas em células trofoblásticas da placenta (CRESSWELL, 1994).

Figura 2 - Representação esquemática do Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe II (B) e Classe I (A).



A estrutura geral do MHC nos mamíferos é relativamente conservada. O complexo BuLA está dividido em três regiões – BuLA-I, BuLA-II e BuLA-III com diferentes funções (Figura 1). Acredita-se que semelhante ao Antígeno Leucocitário bovino (BoLA) existem pelo menos sete genes do MHC-I na região BuLA-I, que são expressos em combinações de um, dois ou três haplótipos diferentes (STAFUZZA et al., 2012). Todavia não há relatos sobre MHC-I diferenciação entre os genes do MHC-I clássico e não clássico.

Figura 3 - Representação esquemática comparando a organização genética do MHC bubalino (BuLA) no cromossomo 2 do *Bubalus bubalis* com MHC bovino (BoLA). (STAFUZZA et al, 2012).



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

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

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

Ao contrário das proteínas do MHC-Ia, as proteínas não clássicas da classe I (MHC-Ib) são expressas em tecidos específicos e sob condições específicas, tais como células trofoblásticas em estágio gestacionais diferentes e células infectadas pelo citomegalovírus (SHU et al, 2012; Wang et al, 2002). Estas proteínas têm frequentemente um domínio citoplasmático truncado. Como resultado de um “splicing” alternativo, estas proteínas são produzidas como isoformas transmembranares e solúveis (HUNT et al., 2005). O processo de *splicing* alternativo determina a natureza segregada ou ligada ao lipídeo de algumas moléculas de classe Ib, tais como HLA-G (HLA-G2) e Qa-2 (HUNT et al., 2006).

Em contraste com as moléculas de classe Ia, que requerem ligação com uma cadeia leve ou de $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2m$) para a sua expressão na superfície celular (TROWSDALE,

2001; SAKAGUCHI, 2000; ISHITANI et al., 1992; TYSOE-CALNON et al., 1991), proteínas de MHC-Ib nem sempre exigem uma cadeia leve para a sua expressão (HUNT et al., 2005).

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

2.6 MHC Classe I na Gestação

Em algumas espécies de mamíferos, as células trofoblásticas maduras não expressam proteínas classe I clássicas extremamente polimórficas (DONALDSON et al., 1990; GOGOLIN-EWENS et al., 1989; HUNT et al., 1987). Em humanos, fetos expressando proteínas de classe I clássicas, durante o primeiro trimestre de gestação não sobrevivem no útero (BEER; BILLINGHAM, 1974).

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

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

O estudo de MHC em bubalinos baseia-se principalmente na localização e polimorfismo dos genes na caracterização molecular do MHC-II (NASKAR et al, 2012; SENA et al, 2003; DE et al, 2002). Estudos relatando atuação do MHC-I na imunidade dessa espécie são escassos. Devido as notórias dificuldades reprodutivas da espécie bubalina em criações tecnificadas (MOAEEN-UD-DIN, 2014; VALE; RIBEIRO, 2005; CAMPANILE, 2004)), intui-se que genes de MHC-Ib influenciam fortemente na manutenção da prenhez. Como já citado, os MHC-Ib são oligomórficos e conservados entre as espécies. Alguns trabalhos descrevem tal complexo na espécie bovina, dentre os genes estudados desse complexo destacam-se o MICB e o NC3 (SANTOS et al, 2015; SHU et al, 2012).

Santos et al (2015) e Shu et al. (2012) e demonstram elevada expressão do gene nos tecidos fetal e placentário no último trimestre de gestação. Os autores sugerem que este gene pode atuar como um inibidor da resposta imune materna e da autoimunidade fetal. Além disso, acredita-se que a transcrição diferencial dos genes clássicos, provavelmente, atua sinergicamente com o gene não clássico NC3, em um mecanismo de proteção imunológica para animais em gestação.

Estudos realizados com placentas de mulheres saudáveis submetidas a interrupção eletiva da gestação (8-14 semanas de gestação), observaram que células trofoblásticas isoladas no início da gravidez expressam mRNAs de MICA e MICB constitutivamente, sugerindo que tal expressão no sinciciotrofoblasto é benéfica para a formação da placenta e promove o escape do embrião da resposta imune materna no primeiro trimestre de gestação (Mincheva-Nilsson et al, 2006).

Embora MIC tenha um efeito importante na resposta imune alogênica ou proteção durante a gestação em seres humanos, não há atualmente nenhum dado funcional relativo ao bubalino, acredita-se que devido à sua grande semelhança com MIC humano e bovino em termos de localização genômica, estrutura genética e perfil de expressão limitada, o MIC bubalino pode desempenhar um papel equivalente ao MIC humano, de acordo com dados descritos por Birch et al. (2008b) e Peng et al., (2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a expressão gênica de MHC de classe I não clássico em placenta bubalina em diferentes estágios de gestação.

3.2 Específicos

- Determinar a cinética da expressão gênica de MHC-I não clássico na placenta bubalina;
- Comparar os níveis de expressão de MHC-I não clássico em diferentes regiões da placenta bubalina;
- Comparar os níveis de expressão de MHC-I não clássico em diferentes estágios de gestação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Expressão MHC I não clássico na placenta bovina

4.1.1 Coletas de amostras

Foram utilizadas 15 placentas de búfalas em diferentes estágios gestacionais (cinco de cada trimestre de gestação) obtidos de abatedouros dos municípios de Viana, Arari e São Luís, Maranhão. O Protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal da UEMA (CETEA-UEMA, Protocolo 11/2014).

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

Imediatamente após o abate, foi feita anti-sepsia cuidadosa do perímetro, utilizando-se álcool iodado, seguida da abertura do útero com exposição e a retirada asséptica de fragmentos de junção materno fetal (placentônio) e córion placentário. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em criotubos estéreis RNase *Free* contendo RNA Later, um reagente de manutenção do RNA, que o estabiliza sob refrigeração, seguido de congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração.

4.1.2 Extração de RNA

Para a extração de RNA, primeiramente o tecido coletado foi macerado e adicionado 1 mL de Trizol (INVITROGEN; CARLSBAD, CA, USA) em microtubo livre de RNase. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio, homogeneizado vigorosamente e incubado em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 $\times g$ por 15 min a 4°C , para separação em três fases. A fase superior foi transferida para outro microtubo e

adicionar-se-á 500 µL de isopropanol, para precipitação do RNA, incubada em temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 12.000 xg por 10 min a 4°C. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70%, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 7.500xg por 5 min a 4°C. Posteriormente, o RNA foi dissolvido em 30 µL de água livre de RNase. A qualidade das amostras foi analisada por espectrofotometria e em seguida foram retrotranscritas em cDNA .

4.1.3 Síntese de cDNA

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

4.1.4 PCR quantitativa pós transcrição reversa (qRT-PCR)

Para caracterizar a expressão de MHC-I não clássico na placenta bubalina durante a gestação, utilizou-se o qRT-PCR a partir do RNA total extraído do placentônio e do córion para amplificação dos genes MICB e NC3.

O qRT-PCR foi realizado utilizando-se 2,5 µl de cDNA, 10 µM do par de iniciadores para cada gene (Tabela 1) e 12,5 µl de SYBR Green qPCR SuperMix (INVITROGEN) em um volume final de 25 µl por reação. Os parâmetros utilizados para o PCR em tempo real foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (BIRCH et al, 2006, utilizando um termociclador ABI 7500).

Tabela 1 - Lista de genes e iniciadores utilizados na qRT-PCR.

| Gene | Iniciadores (5'-3') | Produto | Sequência de referência no NCBI | Referência |
|-------|---|---------|---------------------------------|------------------------|
| MICB | AGAAAGGAGGCTTACATTCCC GCCTGGTAATGCTTGCTTAAC | 199bp | NM_001127317 | Shu et al., 2012 |
| NC3 | AGATGACACGAGATGCCAAG TCG TTCAGGGCGATGTAA | 198bp | DQ140378 | Shu et al., 2012 |
| GAPDH | GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG GCTGACAATCTTGAGGGTGTTG | 195bp | NM_001034034.2 | Davies et al., 2006 |

Os dados foram analisados utilizando o método Ct comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores de Ct foram normalizados com base na expressão de *GAPDH*.

4.2 Análise estatística

Valores de Ct foram obtidos através da RT-PCR quantitativa e analisados de acordo com $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). As análises dos dados obtidos foram realizadas com o auxílio do programa Statistical Analysis for Windows SAS® (SAS, versão 9.3). As variáveis de distribuição não normal (não paramétricas) foram analisadas pelo PROC GLIMMIX, considerando o nível de significância para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um número de significância menor que 0,05; consideramos que houve efeito das variáveis classificatórias e de suas interações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de caracterizar a expressão de MHC-Ib na placenta bubalina durante a gestação, utilizou-se a qRT-PCR com o RNA total extraído do placentônio e região de córion para amplificação dos genes MICB e NC3. Os dados da análise do qRT-PCR demonstraram que a expressão dos MHC-Ib varia em diferentes regiões da placenta bovina ($p < 0,05$) e na expressão dos genes ao longo gestação ($p < 0,05$).

A luz do nosso conhecimento este é o primeiro estudo que caracterizou a expressão de MICB e NC3 em diferentes regiões da placenta bubalina e nos diferentes estágios da gestação. Importante ressaltar-se que os iniciadores utilizados foram preconizados por Shu et al (2012) para detecção da expressão genes de MHC-Ib em bovinos, e esses iniciadores foram capazes de amplificar sequencias de cDNA sintetizadas a partir de RNA bubalino, demonstrando uma possível homologia dos genes MICB e NC3 de bubalinos e bovinos. Esses achados reforçam os relatos de que os *loci* de MHC-Ib são predominantemente conservados entre as espécies (ELLIS e HAMMOND, 2014; BIRCH et al 2008a; BIRCH et al, 2008b; BIRCH et al 2006).

Pratheek et al (2014) demonstram que em anfíbios, macaco rhesus, humanos e camundongos que ao longo da evolução, a interação entre os MHC-Ib e os receptores de células NK e os linfócitos conservaram características muito semelhantes, indicando que as funções mantêm um alto índice de ortologia. Partindo de tais informações, em conjunto com os resultados do presente trabalho, podemos conjecturar que a função do MHC-Ib de bubalino é semelhante às demais espécies, alterando apenas o comportamento da expressão dessas moléculas em diferentes tipos de células.

Os dados da análise do qRT-PCR demonstraram que houve expressão de ambos os genes, os quais apresentaram uma variação entre terços de gestação (Figura 4 e Figura 7). Presume-se que as moléculas de MHC-Ib estão presentes nos tecidos analisados e podem trazer informações importantes sobre a expressão desses genes ao longo da gestação. Estudos prévios relatam que

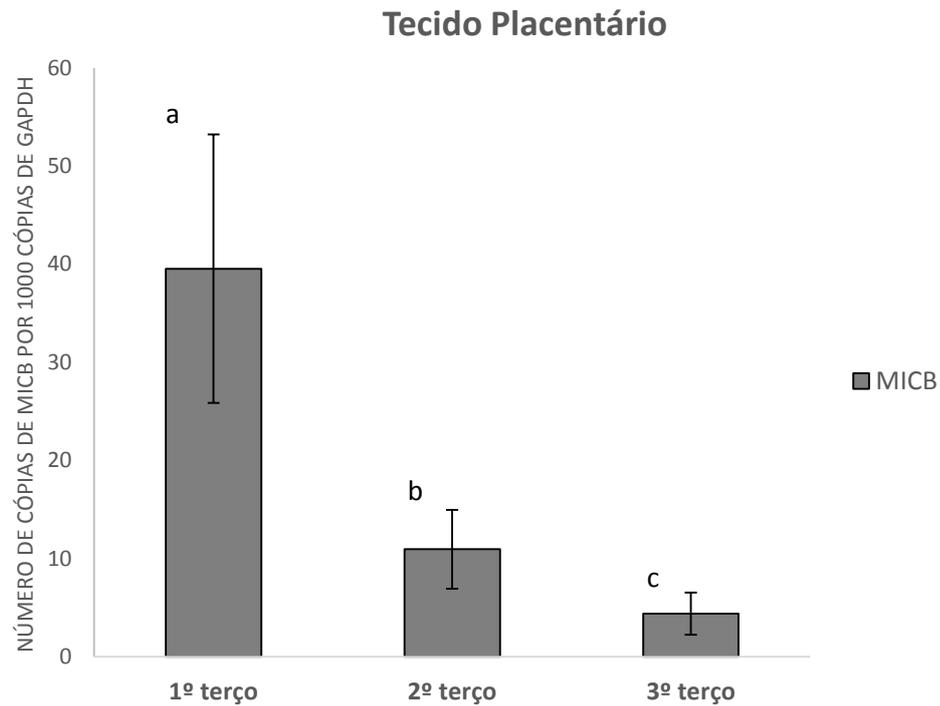
a expressão de genes MHC- I em células trofoblásticas auxiliam na evasão de patógenos e possuem a função de modular, retardar ou mesmo inibir a resposta materna contra o conceito; indicando que no búfalo, semelhante às outras espécies, há uma possível imunomodulação do microambiente uterino, tornando-o um sitio de privilégio imunitário (SANTOS et al, 2015; PIETRA et al, 2009; HUNT et al, 2005; ARLETTAZ et al, 2004; BRAUD et al, 1998).

O MHC-Ib também desempenha funções importantes em casos de infecções virais e bacterianas. Em bovinos, sabe-se que o papilomavírus bovino 4 (BPV-4) regulam negativamente a expressão de MHC-Ia, entretanto, o BPV-4 não possui nenhum efeito sobre alguns genes de MHC-Ib (ARAIBI et al., 2006). Vale a pena ressaltar que o papilomavírus humano, assim como muitos outros vírus, é conhecido apenas por regular negativamente a expressão do MHC-Ia de forma a evadir o sistema imune inato, deste modo o MHC-I não clássico pode enviar um sinal inibitório através da interação com os receptores NK, impedindo a morte celular por citotoxicidade (BOYSEN et al., 2009). Santos et al, em 2015, descreveram que a expressão de genes do complexo MHC-Ib tendeu regular-se positivamente em fragmentos placentários infectados por *Brucella abortus*, indicando a possível participação desse complexo na patogênese bacteriana em células trofoblásticas. Mais estudos da molécula de MHC, e outras moléculas participantes dos mecanismos de resposta imunológica à infecções, poderão ser realizados a partir das informações fornecidas neste trabalho, para que em condições de desafio se alcance um entendimento deste mecanismo na placenta bubalina.

A transcrição de MHC-Ib foi avaliada de acordo com os genes MICB e NC3 que foram expressos em níveis variados em células trofoblásticas da região coriônica e placentônio de bubalinos. O MICB é um dos genes de MHC mais conservados nas espécies bovina e humana. No bubalino, fragmentos amplificados do gene MICB possuem sequências semelhantes aos mesmos genes em bovinos encontrados no GenBank (NCBI), indicando possível homologia (dados não publicados).

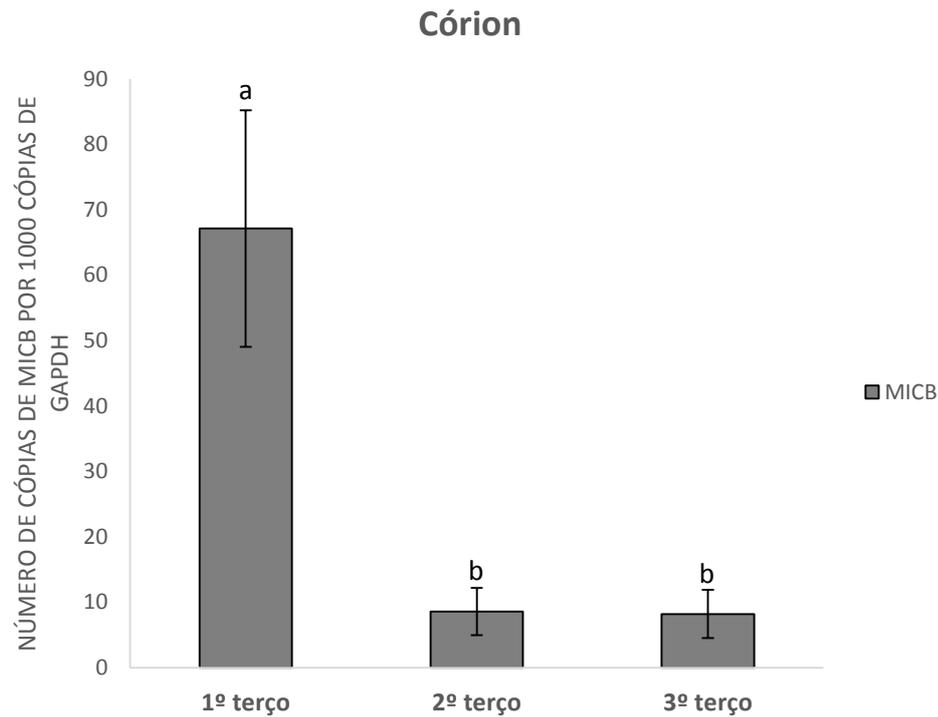
Verificou-se que a expressão do gene MICB decresceu significativamente ao decorrer dos terços gestacionais (Figura 4). Na avaliação da expressão do MICB durante os três terços gestacionais propostos (1º, 2º e 3º trimestre), observou-se a maior expressão nos dois primeiros terços gestacionais com diminuição significativa no último terço (Figura 4). O presente trabalho concorda com Santos et al 2015 e Shu et al 2012 que descreveram uma baixa expressão de MICB na placenta no último terço de gestação. Sabe-se que o MICB consegue apresentar antígenos peptídeos quando ocorre a supressão de MHC-Ia, de forma a controlar possíveis infecções (WANG et al, 2002). Com a maturação do sistema imunológico fetal e com diminuição da tolerância materno fetal (HUNT et al, 2006) é provável que os sistemas imunitários de ambos desenvolvem outros mecanismos imunes adaptativos mais eficientes para o combate aos patógenos intracelulares; decaindo, assim, a necessidade da expressão de MICB. Além disso os trabalhos de Peng et al (2011) e Birch (2008) sugerem que o MICB pode ter um papel também de modulação da resposta de imunitária, via receptor NKG2D. Tal receptor é expressa na superfície de células NK, células T CD8⁺ e subconjuntos de células T CD4⁺, de células NKT invariantes (iTNK) e de células T $\gamma\delta$. O NKG2D serve como um mecanismo para o sistema imunológico para detectar e eliminar as células que tenham sido submetidas a "stress", tais como células infectados por vírus e células neoplásicas (LANNIER, 2015).

Figura 4: Gráfico da expressão de MICB na placenta de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a”, “b” e “c” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais (p<0.05).



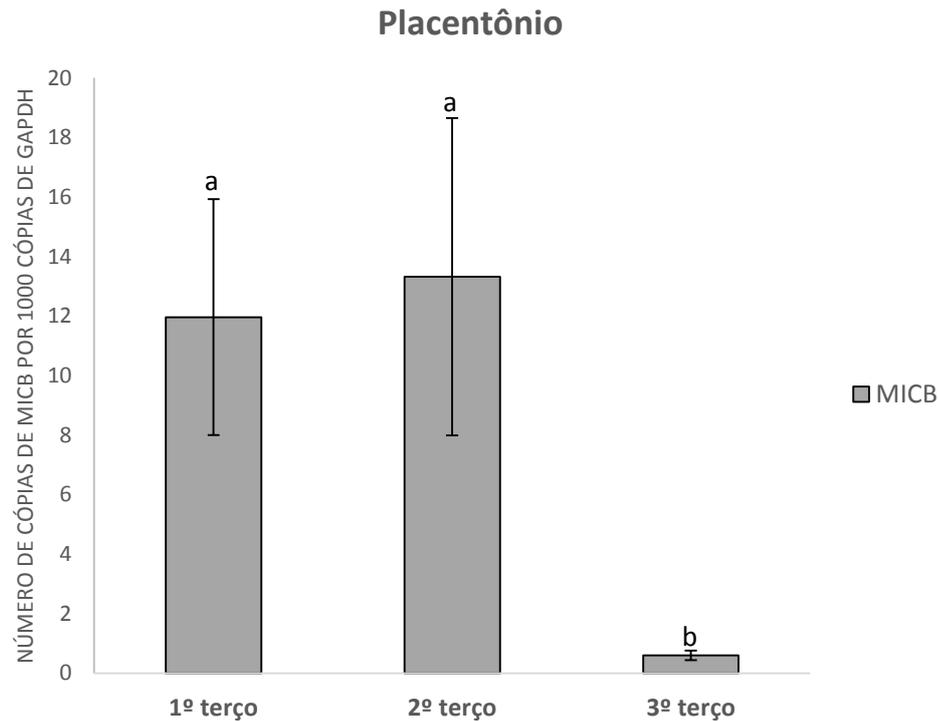
Quando estratificados os dados das regiões (coriônica e placentônio), pode-se observar que a expressão de MICB na região coriônica é significativamente mais elevada no primeiro terço, e reduzida e semelhantes nos dois últimos terços (Figura 5). Gestações bem-sucedidas apresentam uma expressão elevada de MICB em sangue periférico e uma baixa expressão no córion no último terço que pode contribuir para um parto favorável (SANTOS et al, 2015; SHU et al et al, 2012).

Figura 5: Gráfico da expressão de MICB na região de córion de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a” e “b” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$)



Quando analisada a expressão de *MICB* na região de placentônio observa-se uma baixa expressão em todos os terços, concordando com resultados encontrados por Santos et al (2015). Deve-se ter cautela na interpretação da expressão desse gene na região de placentônio, pois estudo feito por Haumonte et al (2014) em humanos sugere que a detecção de isoformas solúveis MIC no plasma pode estar associada com distúrbios de gestação em mulheres. Como supracitado o *MICB* em outras espécies possui função ortóloga de modular a respostas de células imunitárias (Elholm et al 2013; PENG et al, 2011; BIRCH et al, 2008); porém ele pode também constituir como um fator que prejudica tais células para estabelecer o contexto apropriado das etapas de remodelação vascular (HAUMONTE et al 2014). Sabendo-se que placentônio em búfalas é bastante vascularizada, podendo até formar micro hematomas placentários (PEREIRA et al, 2001), a baixa expressão de *MICB* nessa região pode coibir o aparecimento de doenças vasculares graves que afetam a prenhez.

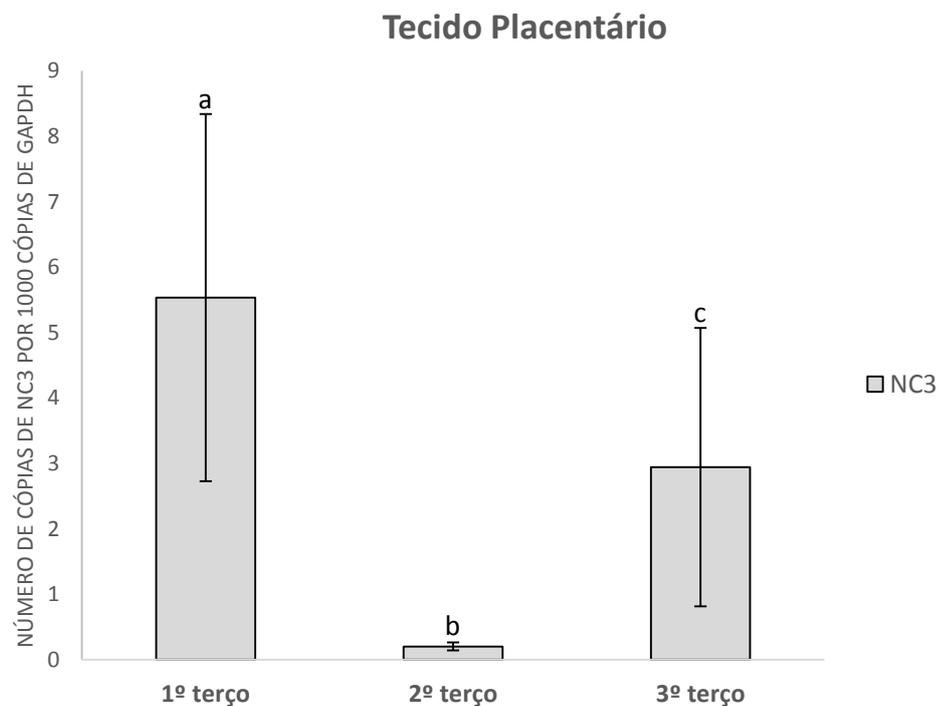
Figura 6: Gráfico da expressão de MICB na região de placentônio de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a” e “b” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$)



A expressão do gene NC3 foi baixa em todos os terços gestacionais em ambos tecidos placentários. Em estudos anteriores observam-se uma importante elevação na expressão do gene NC3, em todos os estágios de gestação na região coriônica que mostrou elevada expressão do gene nos tecidos fetal e placentário no último trimestre de gestação. Santos et al, (2015) e SHU et al., 2012 sugerem que este gene pode atuar como um inibidor da resposta imune materna e da autoimunidade fetal, sendo requeridos especialmente nos primeiros terços para a implantação e manutenção da gestação nos estágios iniciais. Todavia a redução de NC3 pode culminar na intolerância do enxerto semialográfico, levando a uma resposta imunitária materna contra as células trofobláticas. Estudos em humanos relatam que imunidade materna precisa ser

significativamente tolerante no terço inicial quando comparado ao final da gestação, de forma que as células trofoblásticas exteriorizam algumas isoformas solúveis do MHC-Ib (HLA-E e HLA-G em humanos) que estimulam a produção de compostos tolerogênicos como a Interleucina 10 (IL-10) e o Fator de transformação do crescimento- β 1 (TGF- β 1) (HUNT et al, 2006).

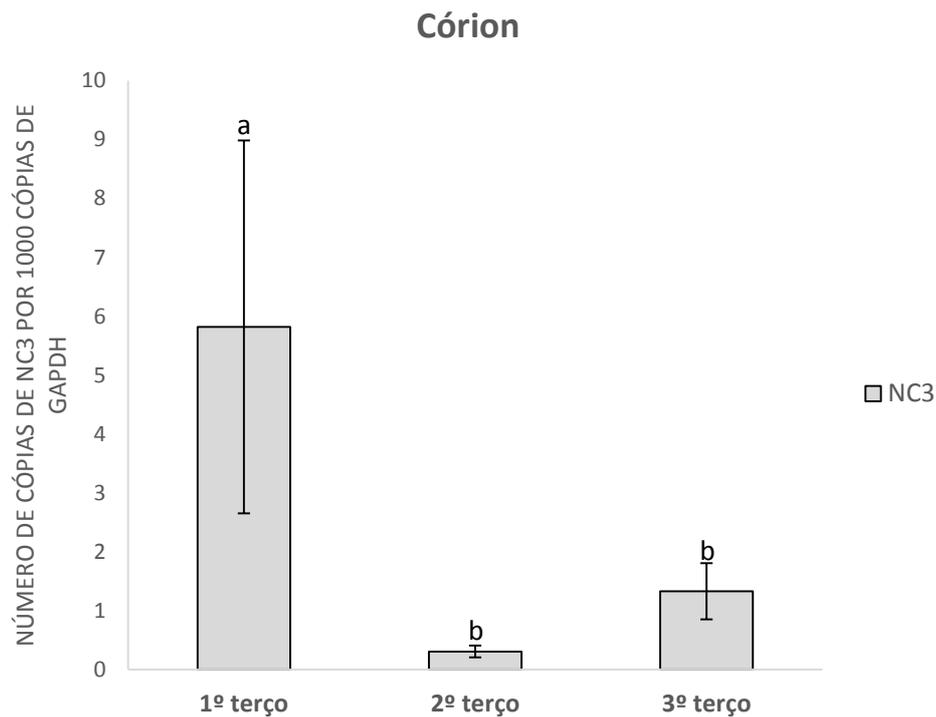
Figura 7: Gráfico da expressão de NC3 na placenta de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a”, “b” e “c” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$).



De acordo com o gráfico da Figura 8, o gene NC3 teve uma baixa expressão no córion, discordando de resultados encontrados por Shu et al (2012) e Santos et al (2015). Tais estudos observam-se uma importante elevação na expressão do gene NC3, em todos os estágios de gestação no córion que mostrou elevada expressão do gene na região coriônica no último

trimestre de gestação; do qual os resultados do presente trabalho também discordam. Verificou-se que a expressão no primeiro terço foi significativamente mais elevada que os demais terços, o que reforça a teoria que o NC3 possui função reguladora da resposta celular e a expressão de MHC-Ib no primeiro terço, permitindo a implantação e manutenção dos primeiros estágios da gestação.

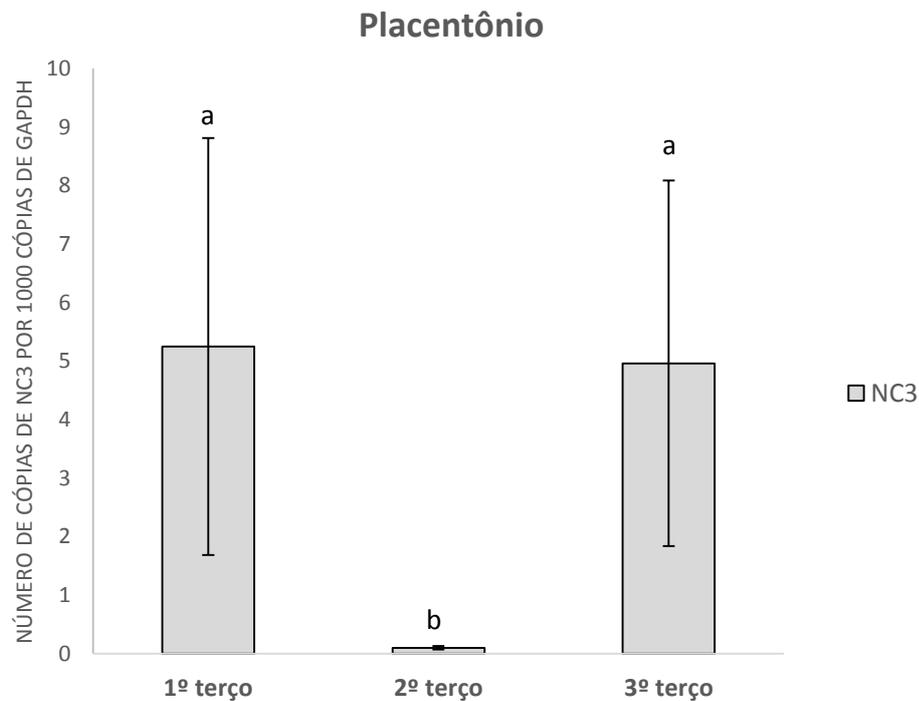
Figura 8: Gráfico da expressão de NC3 no córion de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a” e “b” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$)



Na região de córion, também foram observados níveis baixos de expressão do gene NC3 (Figura 9), concordando com os resultados descritos por Santos et al (2015) em bovinos. Acredita-se que o MHC-Ib (a exemplo o NC3) possui função homóloga ao HLA-G

(BENEDICTUS et al; 2015; SHU et al, 2012). Considerando-se tal informação, a baixa expressão de NC3 possivelmente leva a rejeição do embrião nos primeiros meses, pois uma das funções do HLA-G é modular a expressão de MHC-Ia e evitar a rejeição embrionária. Sendo resultado encontrado no presente trabalho contribui com uma possível justificativa para taxas elevadas de morte embrionária em búfalos descritas por Campinile et al (2005).

Figura 9: Gráfico da expressão de NC3 no placentônio de búfalas em diferentes terços de gestação (primeiro, segundo e terceiro). Colunas representam média aritmética e erro padrão; “a” e “b” representam diferença estatística significativa entre os terços gestacionais ($p < 0.05$)



Interessantemente, podemos ressaltar que a baixa expressão de NC3 pode auxiliar na resposta de agressão e autodestruição das células placentárias, o que é primordial nos primeiros meses de gestação. Todavia estudos demonstram que no terço final de gestação há um decréscimo da população de células T CD8⁺ e aumento da população de células T CD4⁺.

Indicando que a resposta para a separação de tecidos fetais e maternos necessários no periparto é conduzida principalmente via MHC-II, havendo pouca participação da resposta via MHC-I (BENEDICTUS et al, 2015; Oliveira et al., 2013; Davies et al., 2004; Hill et al 2002).

Quando analisados os resultados em conjunto há uma clara participação do gene de MHC no reconhecimento imunológico do feto em búfalas, especialmente no primeiro terço gestacional. Contudo a baixa expressão de NC3 nos tecidos durante a gestação e a baixa expressão de MICB no final da gestação evidencia uma possível interação com outras moléculas ainda não descritas, a fim de viabilizar a gestação em búfalos de forma segura. Tais mecanismos de interação devem ser estudados futuramente para melhor descrição do processo gestacional em bubalinos. Adicionalmente, a participação dos genes de MHC, em condições de infecção por microorganismos, ainda precisa ser definida, bem como a atuação de outras moléculas, especialmente neste período fisiológico determinante da produção nesta espécie, a gestação.

7. CONCLUSÕES

Os iniciadores desenhados para bovinos foram capazes de amplificar cDNA sintetizados a partir de RNA bubalino, indicando certa homologia entres os genes de MHC-Ib bovino e bubalinos, também demonstrando que possivelmente há uma imunomodulação no útero gravídico em búfalos.

Os níveis de expressão de *MHC-Ib* (NC3 e MICB) em diferentes regiões (córion e placentônio) da placenta bubalina variaram, demonstrando a imunidade materno fetal comporta-se diferente entre os tecidos placentários bubalinos.

O gene MICB variou significativamente durante os terços gestacionais em ambos tecidos placentários, notando-se que o ultimo terço teve a menor expressão indicando que há uma possível redução da tolerância materno fetal nesse terço.

O NC3 demonstrou um comportamento de expressão diferente do gene MICB, com uma baixa expressão no segundo terço gestacional. Indicando que o NC3 na búfala não influencia significativamente a indução do periparto, estando provavelmente este processo associado ao MHC-II.

O estudo dos genes de MHC- Ib são pioneiros na espécie bubalina e darão suporte a novos trabalhos que busquem o entendimento do processo gestacional nesta espécie animal.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, V. J.; GARCIA, S. K.. Padrões raciais e registro de bubalinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 29, p. 39-45, 2005.
- ARAIBI, E.H.; MARCHETTI, B.; DORNAN, E.S.; ASHRAFI, G.H.; DOBROMYLSKYJ, M.; ELLIS, S.A.; CAMPO, M.S. The E5 oncoprotein of BPV-4 does not interfere with the biosynthetic pathway of non-classical MHC class I. *Virology* v. 353, p. 174–183, 2006.
- ARLETTAZ, L.; VILLARD, J.; de RHAM, C.; DEGERMANN, S.; CHAPUIS, B.; HUARD, B. ROOSNEK, E. Activating CD94:NKG2C and inhibitory CD94:NKG2A receptors are expressed by distinct subsets of committed CD8+ TCR alphabeta lymphocytes. *Eur J Immunol*, v. 34, 3456-3464, 2004.
- BAHRAM, S.; BRESNAHAM, M.; GERAGHTY, D.E.; SPIES, T. A second lineage of mammalian MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 91, p. 6259–6263, 1994.
- BAINBRIDGE, D.R. Evolution of mammalian pregnancy in the presence of the maternal immune system. *Rev Reprod*, v. 5, p. 67–74, 2000.
- BEER, A.E.; BILLINGHAM, R.E. Host responses to intra-uterine tissue, cellular and fetal allografts. *J Reprod Fertil Suppl*, v. 21, p. 59-88, 1974.
- BENEDICTUS, L.; KOETS, A. P.; RUTTEN, V. P. M. G. The role of placental MHC class I expression in immune-assisted separation of the fetal membranes in cattle. *J Reprod Immunol*, v. 10, n. 112, p.11-19, 2015.
- BIRCH, J., MURPHY, L., MACHUGH, N. D., ELLIS, S. Generation and maintenance of diversity in the cattle MHC Class I region. *Immunogenetics*, v. 58, n. 8, p. 670-679, 2006.

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

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

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

BRAUD, V. M.; ALLAN, D.S.; O'CALLAGHAN, C. A.; SÖDERSTRÖM, K., D'ANDREA, A.; OGG, G. S., LAZETIC, S.; YOUNG, N. T.; Bell J. I.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L. , McMICHAEL A. J. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, v. 391, p. 795-799, 1998.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; GALERO, G.; PRANDI, A.; DI PALO, R.; D'OCCHIO, M.J.; ZICARELLI, L. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology*. v.63, p.2334-2340, 2005.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; GALERO, G.; PRANDI, A.; DI PALO, R.; D'OCCHIO, M.J.; ZICARELLI, L. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology*. v.63, p.2334-2340, 2005.

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

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

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

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

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.

DE, S.; SINGH, R.K.; BUTCHAIHAH, G. MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Genet*, v.33, p.215-219, 2002.

DIMEO G.P., PERUCATTI A., FLORIOT S. et al. An extended river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 68 autosomal *loci* by FISH-mapping and R-banding and comparison with human chromosomes. *Chromosome Research*, 16, 827–3, 2008.

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

ELLIS, S. A.; HAMMOND, J. A. The functional significance of cattle major histocompatibility complex class I genetic diversity. *Annu Rev Anim Biosci*, v.; 2, p. 285–306, 2014.

FIGUEIREDO, E.L.; LOURENÇO JÚNIOR, J.B.; TORO, M.J.U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “in natura” produzido no estado do Pará. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 04, p. 19-28, 2010.

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.

GUDE, N. M.; ROBERTS, C. T.; KALIONIS, B.; KING, R. G. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*, v. 114, p. 397–407, 2004.

HAUMONTE, J. B.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; BRETTELLE, F.; LAMBERT, M.; LYONNET, L.; LEVY-MOZZICONAZZI, A.; FARNARIER, C.; AUBERT, A.; BOUBLI, L.; CAMOIN-JAU, L.; GEORGE, F. D.; PAUL, P. Enhanced Prevalence of Plasmatic Soluble MHC Class I Chain-Related Molecule in Vascular Pregnancy Diseases. *BioMed Resear Intern*, v. 2014, p. 1-11, 2014

HILL, J. R.; SCHLAFER, 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. *Biol. Reprod*, v.67, p.55–63, 2002.

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

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

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

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

IANNUZZI L.; GALLAGHER D.S.; WOMACK J.E.; DI MEO G.P.; SKOW L.C.; FERRARA L.C. Chromosomal localization of the major histocompatibility complex in cattle and river buffalo by fluorescent in situ hybridization. *Hereditas* 118, 187–90, 1993.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pecuária 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ma&tema=pecuaria2010>. Acesso em: 31 de janeiro de 2015.

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

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, DE. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol*, v.171, p.1376–1384, 2003.

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

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

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

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

LANIER, L. L. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*. v. 3, n.6, p. 575-582, 2015

LEITE, R. C.; BASTIANETTO, E. Doenças infecciosas em búfalos. *Ciênc Anim Bras*, v. 0, n. 0, 2009.

- LIVAK, J.; SCHMITTGEN, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001
- LYNGE, N. L.; DJURISIC, S.; HVIID, T. V.; Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction. *Front Immunol*, v. 5, p. 198, 2014.
- MANO FILHO, A. C. Búfalos no Brasil e sua contribuição à sociedade. *Revista dos Criadores*, São Paulo, v. 12, p. 21-23, 1987.
- MIHAIU, R.; MIHAIU, M.; PINTEA, A.; BELE, C.; LAPUSAN, A.; DAN, S.D.; TAULESCU, C.; CIUPA, A. Comparative study on the fat acids profile from buffalo milk as quality and traceability markers. *Veterinary Medicine*, v. 67, p. 161-165, 2010.
- MINCHEVA-NILSSON, L.; NAGAEVA, O.; CHEN, T.; STENDAHL, U.; ANTSIFEROVA, J.; MOGREN, I.; HERNESTÅL, J.; BARANOV, V. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol*. v. 176, n. 6, p.3585-92, 2006.
- MOAEEN-UD-DIN, M. Buffalo genome research - a review. *Animal Science Papers and Reports* v. 32, p. 187-199, 2014.
- MOORE, K.L; PERSAUD, T.V.N. *Embriologia básica*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- MUNIZ, L. A criação de búfalos na baixada maranhense: uma análise do desenvolvimentismo e suas implicações sócio-ambientais. III Jornada internacional de Políticas Públicas, São Luís, 2007.
- NAIB, A.; 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. *J Reprod Immunol*. v. 91, n. 1-2, p. 31-40, 2011.

NASKAR, S.; DEB, S. M.; NINJARAN, S. K.; KUMAR, S.; SHARMA, D.; SAKARAM, D.; SHARMA, A. Molecular characterization of MHC-DRB cDNA in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, p. 95-98, 2012.

NIRANJAN, S.K.; DEB, S.M.; SHARMA, A.; MITRA, A.; KUMAR, S. Isolation of two cDNAs encoding MHC-DQA1 and DQA2 from the water buffalo, *Bubalus bubalis*. *Vet Immunol Immunopathol*, v.130, p.268-271, 2009.

OHASHI, O.; MIRANDA, M. S.; SANTOS, S. D.; CORDEIRO, M. S.; COSTA, N. N.; SILVA, T. V. (). Distúrbios reprodutivos do rebanho bubalino nacional. *Ciênc. Anim*, v. 22, p.171-187, 2012 .

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

PEREIRA, F. T. V.; MIGLINO, M. A.; BEVILACQUA, E.; CARVALHO, A. F. Aspectos morfológicos dos hematomas placentários da placenta do búfalo (*Bubalus bubalis bubalis* -- Linnaeus, 1758). *Braz J Vet Res Anim Sci*, v. 38, n. 4, p. 151-154, 2001

PIETRA, G.; ROMAGNANI, C.; MORETTA, L.; MINGARI, M. C. HLA-E and HLA-E-bound peptides: recognition by subsets of NK and T cells. *Curr Pharm Des*, v. 15, p. 3336-3344, 2009.

PRATHEEK, B. M.; NYAK, T. K; SAHOO, S. S.; MOHANTY, P.K.; CHATTOPADHYAY, S.; CHAKRABORTY, N. G.; CHATTOPADHYAY, S. Mammalian non-classical major histocompatibility complex I and its receptors: Important contexts of gene, evolution, and immunity. *Indian J Hum Genet*, v. 20, n. 2, p. 129–141, 2014.

RANJHAN, S. K. Safety and quality aspects of buffalo meat and meat products. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, v. 22, p. 365-370, 2012.

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

RODRIGUES, E.A.F.; STAFUZZA, N.B.; CAETANO, A.R.; GILL, C.A.; RIGGS, P.K.; WOMACK, J.E.; AMARAL, M.E. Mapping MHC genes in river buffalo. *Dev Biol*, v.132, p.343-346, 2008.

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

SANTOS, L. S.; Mol, J. P. S; MACÊDO A. A. CARVALHO-SILVA; RIBEIRO, R. L. S; SANTOS, R. L.; PAIXÃO, T. A; CARVALHO-NETA, A. V. Transcription of non-classic major histocompatibility complex (MHC) class I in the bovine placenta throughout gestation and after *Brucella abortus* infection. *Vet Immunol Immunop*, v. 167, p. 166-170, 2015.

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

SENA, L.; SCHNEIDER, M.P.C.; BRENIG, B.; HONEYCUTT, R.L.; WOMACH, J.E.; SKOW, L.C. Polymorphisms in MHC-DRA and DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. *Anim Genet* v.34, p.1-10, 2003.

SENA, L.; SCHNEIDER, M.P.C.; BRENIG, B.; HONEYCUTT, R.L.; WOMACH, J.E.; SKOW, L.C. Polymorphisms in MHC-DRA and DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. *Anim Genet* v.34, p.1-10, 2003.

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

STAFUZZA, N. B.; GRECO, A. J.; GRANT, J.R.; ABBEY, C. A.; GILL, C. A.; RAUDSEPP, T.; SKOW, L. C.; WOMACK, J. E.; RIGGS, P. K.; AMARAL, M. E. A high-resolution radiation hybrid map of the river buffalo major histocompatibility complex and comparison with BoLA. *Anim Genet.*, v. 44, p. 369-376, 2012.

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

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

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

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. *Rev Bras Reprod Anim*, v.29, p.63-73, 2005.

VANCE, R.E.; JAMIESON, R.M.; RAULET, D.H. Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse NK cells. *J Exp Med*, v.190, p.1801–1812, 2002.

VIEIRA, J. N.; TEIXEIRA, C. S.; KUABARA, M. Y.; OLIVEIRA, D. A. A. Bubalinocultura no Brasil: Short communication. *Pubvet*, Londrina, v. 5, n. 2, p. 1003, 2011.

WANG, E.; MCSHARRY, B.; RETIERE, C.; TOMASEC, P.; WILLIAMS, S.; BORYSIEWICZ, L.K.; BRAUD, V.M.; WILKINSON, G.W. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 99, p.7570–7575, 2002.

WEI, X.; ORR, H.T. Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Human Immunology*, v.29, p.131, 1990.

YUSUF,, M.; BACO, S.; KARIM, M. N. Current Status of Reproductive Management in Buffalo in West Sulawesi Province, Indonesia. *Open Journal of Forestry*, v. 13, p. 1-3, 2013.

ZINKERNAGEL, R.; DOHERTY, P. H-2 compatability requirement for T-cellmediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures coded for in H-2K or H-2D. *J Exp Med*, v. 141, p. 1427-1436, 1975. LOW, B.G.; HANSES, P. J.; DROST, M.; GOGOLIN-EWENS, K. J. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine placenta. *J Reprod. Fert*, v. 90, p. 235-243, 1990.