

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**BRENO LUIZ MELO LIMA**

*Expressão gênica de moléculas associadas com a modulação do sistema imune, Qa1, Qa2, Qa10 e Aire, durante a ontogenia de órgãos linfóides murinos*

Ribeirão Preto  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**BRENO LUIZ MELO LIMA**

***Expressão gênica de moléculas associadas com a modulação do sistema imune, Qa1, Qa2, Qa10 e Aire, durante a ontogenia de órgãos linfóides murinos***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia Básica e aplicada

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

**Ribeirão Preto  
2010**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Melo-Lima, Breno Luiz

Expressão gênica de moléculas associadas com a modulação do sistema imune, Qa1 Qa2, Qa10 e Aire, durante a ontogenia de órgãos linfóides murinos.

**135 p., :II; 30 cm**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Orientador: Donadi, Eduardo Antonio.

1. Tolerância imunológica. 2. HLA-G e HLA-E 3. Qa-2 e Qa-1. 4. Aire. 5. Ontogenia 6. Timo 7. Órgãos linfóides

## FOLHA DE APROVAÇÃO

MELO-LIMA, B.L. Expressão gênica de moléculas associadas com a modulação do sistema imune, Qa1 Qa2, Qa10 e Aire, durante a ontogenia de órgãos linfóides murinos. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado nos Laboratórios de Imunologia Molecular / HC - FMRP, Biologia Molecular / Anexo A – FMRP e Imunogenética Molecular / Departamento de Genética – FMRP, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP, Brasil com auxílio financeiro do Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo: 132128/2008-0.

**E di chi sarà il coraggio, allora, se non sarà il mio?**

se si spegne quella luce resto io

**di chi è la più profonda decisione?**

al di là dei sogni appesi ad una canzone

oggi riconosco il suono

della voce di chi sono...

**...l'uragano che mi gira intorno sono solo io**

vedo la speranza in fondo a quell'oblio

**il difetto è l'esperienza che non ho ancora**

ma non me ne prendo cura, non ho più paura

da me, torno da me

perchè ho imparato a farmi compagnia

dentro di me, ripeto una bestemmia una poesia

bella come io non l'ho sentita mai, io mai

**occhi dritti all'orizzonte**

**sull'asfalto lascio le mie impronte...**

**...scopro in uno specchio il cielo**

**e la geografia del mio cammino**

del mio cammino...

(La Geografia del Mio Cammino- Pausini-cheope-agliardi)

*Si j'étais quelqu'un*

**Mon esprit serait roi**

*Comme les autres*

*Je regarderais passer un train*

*Si j'étais quelqu'un*

**Je partirais loin dans la vie...**

*Si j'étais quelqu'un*

*Je serais dans un nuage*

*Comme les autres*

**Je dormirais comme un sage**

*Si j'étais quelqu'un*

*Comme les autres... quelqu'un*

**Comme les autres...**

(*Si j'étais quelqu'un* - Nathalie Nechtschein / Erick Benzi)

*Dedico este trabalho às pessoas que mais amo na vida:*

*Especialmente à minha mãe, **Ana Isabel**, pelo amor incondicional, por todo apoio em tudo em minha vida e por ser meu exemplo de dignidade, força e garra. Ela é a razão de eu estar aqui! Obrigado por tudo! Te amo mãe!*

*À minha avó, **mamãe Terezinha**, por ser meu exemplo de inteligência, amor e compaixão ao próximo.*

*À minha irmã **Beahinha**. É pra você também pequena, todo este esforço!*

*À minha família,*

*Amo vocês!*



## ***Agradecimentos***

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade.

Ao meu orientador Prof° Dr. Eduardo Antonio Donadi, por quem tenho grande admiração e respeito, pela competência, personalidade e polidez com que trata os alunos e colegas. Obrigado por me aceitar como seu aluno, acreditar no meu trabalho e depositar em mim a confiança durante esses anos.

Ao Prof° Dr. Geraldo Passos, por me permitir trabalhar em seu laboratório e pelos conselhos que foram sempre bem-vindos ao longo deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Danielle Magalhães, por toda a gentileza e ajuda durante a obtenção das amostras fetais.

Ao Di Maule, por ser um irmão, amigo, família. Obrigado por tudo que você fez e faz por mim. Acho que nem em 3 reencarnações vou conseguir te agradecer. Obrigado de verdade, de coração! Be like that!!

À minha amiga Adriane, que logo no primeiro dia, no primeiro olhar já percebi que iria ser alguém que eu levaria pra vida inteira. Obrigado pela ajuda sempre! Seja na análise estatística ou na bancada, ou mesmo nos assuntos da alma! Amo você Feijons!! Sem esquecer da Titão, chuchu do meu coração! Brilha em Brighton! Amo vc!

Aos Ordinários: Felipe, Natália, Nazário... 'Cadê o meu loraxx?' Sem vocês Ribeirão não teria nenhuma graça!! Amo vocês irmãos! Te amo brasil! te amo ya fuera!

Aos autistas Ludi, Renata, Yara, João Pancoto, Gustavo, Rafael Aveiro. Vocês romperam as barreiras do laboratório e se tornaram uma família aqui em Ribeirão!

Aos amigos de Fortaleza: Ju, Ge, Italo, Rafa, Ed, Peu, Norton, Anna Patrícya, Darling, Zoel, e as 'cunhãs' Maíra e Narja. Muitas saudades!!

Aos amigos de Campinas: Pedroca (e sua família), Deh, Lê, Patrícia, Angela, Rô, Edu, Leo Norder Cissão, Mari, Aline, Paulette, Silvana...

Aos outros amigos que fiz em Ribeirão: Marquinhos, Deyse, Oficiati, Rafael, Matheus, João Ricardo, Weriky, Estelinha, Robson e Thiagomendobau.

Aos amigos que estão longe, mas sempre perto: Ariane 'oncinha ppl', Lillian, Gra e Crau 'Fácil'.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Molecular/HC-FMRP e de Biologia Molecular/FMRP: Diane, Jana, Andrezza, Daiani, Rafael, Kim, Maria, Leo, Régia, Isabela, Eric e Luciana. Com vocês os dias de bancada se tornaram mais divertidos! Obrigado!

Às meninas do Grupo de Imunogenética Molecular: Erna, Renatinha, Luciana, Flávia, Márcia, Natália, Jana, Claudinha, Paulinha e Thais. Obrigado pelas risadas e, sobretudo pela ajuda com o RNA!

Aos amigos que fiz pelos Journals da imuno, corredores e disciplinas da USP: Gabi, Ana Elisa, Daiane Santos, Rodrigo 'mastócitos', Piá, Bera, Alessandra, Carol 'furinho', Ju Ueda, Paola, Cássia, Marina, Rafael, Patrícia, Ricardo 'baiano'.

Às técnicas dos laboratórios Neifi e Sandra. Obrigado pelas risadas, disponibilidade e ajuda sempre! A Letícia, Wendy e Bia do laboratório de endocrinologia do HC-FMRP. Obrigado pela ajuda com o real-time.

À Aninha, secretária da pós. Obrigado pelas palavras e ajuda desde o primeiro dia em que me viu. Desde o dia da prova de seleção (fugido pra Campinas) até os dias da disciplina do BOPE!

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

E por último, mas não menos importante: aos animais do laboratório, especialmente aos fetos, que tornaram esse trabalho realizável.

## RESUMO

Qa-2 e Qa-1 são moléculas murinas não-clássicas do MHC de classe I e são os homólogos funcionais do HLA-G e HLA-E, respectivamente. Essas moléculas estão envolvidas na modulação do sistema imune através da inibição da ação de células T CD8<sup>+</sup> e células NK pela interação com receptores de inibição. Outra molécula não-clássica do MHC de classe I, a molécula Qa10 é característica do fígado e pode ser encontrada em altas concentrações na circulação. O *Aire* (*autoimmune regulator*) é o regulador transcricional responsável pela expressão de milhares de antígenos tecido-específicos da medula tímica promovendo o fenômeno de expressão gênica promiscua durante o processo de seleção negativa de timócitos. Falhas na expressão do *Aire* estão relacionadas com a ocorrência de graves manifestações autoimunes. Com o objetivo de caracterizar a expressão de genes envolvidos na modulação das respostas imunes, o presente estudo avaliou a expressão gênica de *H2-Q7*(Qa-2), *H2-T23*(Qa-1), *H2-Q10*(Qa10) e *Aire* durante o desenvolvimento fetal e pós-natal do timo, de órgãos linfóides periféricos e de sítios imunologicamente privilegiados em animais das linhagens C57BL/6 e BALB/c. Foram obtidas amostras de RNA dos órgãos durante o período fetal (E13.5 a E20.5) e pós-natal (1, 5, 10, 15, 45 e 60 dias). A quantificação da expressão gênica foi realizada pela técnica de PCR em tempo-real e os resultados expressos em escala de quantificação relativa (QR) calculados através do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . No timo, transcritos para o gene *H2-Q7* foram detectados em níveis elevados ao longo de todo o desenvolvimento, com níveis aumentados na fase adulta ( $P < 0,001$ ). No período fetal, *H2-Q7* foi mais expresso em timo fetal com E20.5 dias ( $P < 0,05$ ), período de ocorrência dos processos de seleção tímica. Os perfis de expressão de *H2-Q7* no timo, e em órgãos linfóides periféricos, mostraram padrões distintos, caracterizado pelo aumento gradativo nos níveis de transcritos de acordo com o avanço da idade do animal. O perfil de expressão de *H2-T23* se manteve sem grandes variações ao longo da ontogenia do timo. Fígado e intestino, respectivamente, foram os órgãos que expressaram os níveis mais elevados de *H2-T23* com tendência ao aumento de acordo com a idade ( $p < 0,001$ ). O gene *H2-Q10* foi expresso preferencialmente pelo fígado em níveis 5 vezes mais elevados na fase adulta. A análise do perfil de expressão de *Aire* no timo mostrou que o pico de expressão desse gene ocorreu por volta do dia E16.5 em animais C57BL/6, e dia E18.5 em BALB/c ( $P < 0,001$ ). Em ambas as linhagens, a expressão de *Aire* foi detectada, em níveis diminuídos, durante a fase adulta do timo e, ainda, em órgãos linfóides periféricos em diferentes idades. Na placenta, de maneira geral, os níveis de mRNA de todos os genes diminuíram com o avanço da gestação. No cérebro não detectamos níveis consideráveis de genes de classe Ib. De maneira geral, as linhagens C57BL/6 e BALB/c apresentaram perfis de expressão gênica semelhantes, entretanto, com níveis de transcritos diferentes, variando de acordo com a fase de desenvolvimento de cada órgão. Esses resultados sugerem que genes não-clássicos do MHC começam a ser expressos cedo durante a ontogenia dos órgãos linfóides e os seus níveis variam de acordo com a idade do animal, podendo estar relacionados com a manutenção dos mecanismos atuantes na manutenção da tolerância imunológica.

**Palavras chaves:** Tolerância imunológica, Qa-2/Qa-1, Aire, Ontogenia, órgãos linfóides

## ABSTRACT

Qa-2 and Qa-1 are murine non-classical MHC class I molecules and their human functional homologues are HLA-G and HLA-E, respectively. These molecules are involved on the modulation of immune responses by interacting with of T CD8<sup>+</sup> and NK cell inhibitory receptors. Another non-classical MHC class I molecule, Qa10 is liver-specific and can be found at high concentrations in the serum. The gene *Aire* (*autoimmune regulator gene*) is the transcriptional regulator responsible for the expression of thousands of tissue-related antigens in thymic medulla through the phenomenon of promiscuous gene expression during negative selection. Failures in the expression of *Aire* are related to severe autoimmune manifestations. Aiming to characterize the expression of genes involved on the modulation of immune responses, in this study we evaluated the gene expression of *H2-Q7*(Qa-2), *H2-T23*(Qa-1), *H2-Q10*(Qa10) e *Aire* during fetal and postnatal development of thymus, peripheral lymphoid organs and immunologically privileged sites. RNA samples were obtained from the organs during fetal (E13.5 to E20.5) and postnatal (1, 5, 10, 15, 45 and 60 days) from mice of two different strains, C57BL/6 and BALB/c. Quantification of gene expression was performed by real-time PCR and the results expressed by relative quantification (RQ) calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. In the thymus, transcripts for *H2-Q7* were detected at high levels throughout the organ development, with increased levels in adult mice (P <0.001). In the fetal period, *H2-Q7* expression was increased in fetal thymus with E20.5 days (P <0.05). The expression profiles of *H2-Q7* in thymus and peripheral lymphoid organs showed distinct patterns, characterized by a gradual increase in levels of transcripts according to the age of the animal. The expression profile of *H2-T23* remained without major changes during ontogeny of the thymus. Liver and gut, respectively, showed the highest levels for *H2-T23* expression with a tendency to increase according to age. The gene *H2-Q10* was expressed preferentially by the liver at levels five times higher in adult mice. The analysis of the expression profiles of *Aire* in the thymus showed that the highest expression occurred around E16.5 days in C57BL/6 and day E18.5 in BALB/c mice (P<0.001). In both strains, the expression of *Aire* was detected at reduced levels in adult thymus, and also in peripheral lymphoid organs at different ages. In placenta, in general, the mRNA levels of all genes decreased with advancing gestation. In the brain did not detect significant levels of class Ib genes. In general, C57BL/6 and BALB/c mice showed similar profiles of gene expression, however, exhibiting transcriptional levels varying according to the stage of development of each organ. These results suggest that non-classical MHC class I genes begin to be expressed early during the ontogeny of lymphoid organs and their levels vary with the age of the animal, findings that may be related to the mechanisms for maintenance of immunological tolerance

**Keywords:** Immune tolerance, Qa-2/Qa-1, Aire, lymphoid organs ontogeny

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Mapa detalhado do MHC humano.....   | <b>3</b>  |
| <b>Figura 2.</b> Características das proteínas HLA-G solúveis e de membrana geradas por edição alternativa do mRNA.....  | <b>4</b>  |
| <b>Figura 3.</b> Isoformas de Membrana e solúveis do HLA-G e do seu homólogo murino Qa-2.....  | <b>10</b> |
| <b>Figura 4.</b> Regulação das respostas de células T CD4 <sup>+</sup> por células T CD8 <sup>+</sup> reguladoras e por células NK através do envolvimento de moléculas Qa-1 ..... | <b>16</b> |
| <b>Figura 5:</b> Fluxograma da estratégia experimental .....   | <b>28</b> |
| <b>Figura 6.</b> Desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores durante a gestação de camundongos (E 10.5 a E17.5).....  | <b>30</b> |
| <b>Figura 7.</b> Desenvolvimento dos órgãos do sentido (modificações externas) durante a gestação de camundongos (E12.5 a E17.5).....  | <b>31</b> |
| <b>Figura 8.</b> Características morfológicas de fetos ao longo da gestação com idades de E13.5 a 17.5.....  | <b>42</b> |
| <b>Figura 9.</b> Características morfológicas de fetos com idades de E18.5 a recém- nascido.....   | <b>43</b> |
| <b>Figura 10.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5 % mostrando o fracionamento das amostras de RNA total de alguns órgãos de fetos de camundongos C57BL/6.....                   | <b>43</b> |
| <b>Figura 11.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5 % mostrando o fracionamento das amostras de RNA total de alguns órgãos de camundongos BALB/c.....                             | <b>43</b> |
| <b>Figura 12.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-Q7</i> durante o desenvolvimento do timo .....   | <b>45</b> |
| <b>Figura 13.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-Q10</i> durante o desenvolvimento do timo .....  | <b>45</b> |
| <b>Figura 14.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-T23</i> durante o desenvolvimento do timo.....   | <b>46</b> |
| <b>Figura 15.</b> Perfil de expressão do gene <i>Aire</i> durante o desenvolvimento do timo .....  | <b>47</b> |
| <b>Figura 16.</b> Perfil de expressão dos genes <i>H2-Q7</i> , <i>H2-Q10</i> , <i>H2-T23</i> e <i>Aire</i> durante o desenvolvimento do timo em animais C57BL/6.....               | <b>48</b> |
| <b>Figura 17.</b> Perfil de expressão gênica de <i>H2-Q7</i> e <i>H2-T23</i> durante o desenvolvimento pós-natal do baço .....   | <b>49</b> |
| <b>Figura 18.</b> Perfil de expressão gênica de <i>H2-Q10</i> e <i>Aire</i> durante o desenvolvimento pós-natal do baço.....   | <b>50</b> |
| <b>Figura 19.</b> Perfis de expressão dos genes <i>H2-Q7</i> , <i>H2-Q10</i> , <i>H2-T23</i> e <i>Aire</i> durante o desenvolvimento pós-natal do baço em animais C57BL/6. ....    | <b>51</b> |
| <b>Figura 20.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-Q7</i> durante o desenvolvimento do fígado. ....   | <b>52</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figura 21.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-Q10</i> durante o desenvolvimento do fígado. ....   | <b>53</b>  |
| <b>Figura 22.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-T23</i> durante o desenvolvimento do fígado .....   | <b>54</b>  |
| <b>Figura 23.</b> Perfil de expressão do gene <i>Aire</i> durante o desenvolvimento do fígado.....  | <b>54</b>  |
| <b>Figura 24.</b> Perfis de expressão dos genes <i>H2-Q7</i> , <i>H2-Q10</i> , <i>H2-T23</i> e <i>Aire</i> durante o desenvolvimento do fígado em animais C57BL/6 .....   | <b>55</b>  |
| <b>Figura 25.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-Q7</i> durante o desenvolvimento do intestino.....  | <b>56</b>  |
| <b>Figura 26.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-Q10</i> durante o desenvolvimento do intestino.....   | <b>57</b>  |
| <b>Figura 27.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-T23</i> durante o desenvolvimento do intestino.....   | <b>58</b>  |
| <b>Figura 28.</b> Perfil de expressão do gene <i>Aire</i> durante o desenvolvimento do intestino .....  | <b>58</b>  |
| <b>Figura 29.</b> Perfis de expressão dos genes <i>H2-Q7</i> , <i>H2-Q10</i> , <i>H2-T23</i> e <i>Aire</i> durante o desenvolvimento do intestino em animais C57BL/6..... | <b>59</b>  |
| <b>Figura 30.</b> Perfil de expressão gênica de <i>H2-Q7</i> e <i>H2-T23</i> na placenta durante a evolução da gestação ..  | <b>61</b>  |
| <b>Figura 31.</b> Perfil de expressão gênica de <i>H2-Q10</i> e <i>Aire</i> na placenta durante a evolução da gestação .....  | <b>61</b>  |
| <b>Figura 32.</b> Perfis de expressão dos genes <i>H2-Q7</i> , <i>H2-Q10</i> , <i>H2-T23</i> e <i>Aire</i> durante a evolução da gestação em placentas de C57BL/6. ....   | <b>62</b>  |
| <b>Figura 33.</b> Quantificação relativa do RNAm de <i>H2-Q7</i> durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais C57BL/6.....                                   | <b>65</b>  |
| <b>Figura 34.</b> Quantificação relativa do RNAm de <i>H2-T23</i> durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais C57BL/6.....                                  | <b>65</b>  |
| <b>Figura 35.</b> Quantificação relativa do RNAm de <i>H2-Q10</i> durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais C57BL/6.....                                  | <b>66</b>  |
| <b>Figura 36.</b> Quantificação relativa do RNAm de <i>Aire</i> durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais C57BL/6.....                                    | <b>66</b>  |
| <b>Figura 37.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-Q7</i> durante o desenvolvimento do cérebro .....   | <b>109</b> |
| <b>Figura 38.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-T23</i> durante o desenvolvimento do cérebro .....  | <b>109</b> |
| <b>Figura 39.</b> Perfil de expressão do gene <i>H2-Q10</i> durante o desenvolvimento do cérebro.....   | <b>110</b> |
| <b>Figura 40.</b> Perfil de expressão do gene <i>Aire</i> durante o desenvolvimento do cérebro .....  | <b>110</b> |
| <b>Figura 41.</b> Perfis de expressão dos genes <i>H2-Q7</i> , <i>H2-Q10</i> , <i>H2-T23</i> e <i>Aire</i> em cérebros de animais C57BL/6 em diferentes idades.....       | <b>111</b> |

**Figura 42.** . Quantificação relativa do RNAm de *H2-Q7* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c..... **111**

**Figura 43.** Perfil Quantificação relativa do RNAm de *H2-Q10* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c. .... **112**

**Figura 44.** Quantificação relativa do RNAm de *H2-T23* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c ..... **112**

**Figura 45.** Quantificação relativa do RNAm de *Aire* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c ..... **112**

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabela 1.</b> Descrição da morfologia dos fetos durante a evolução da gestação.....  | <b>30</b>  |
| <b>Tabela 2.</b> Reagentes e concentrações utilizadas para o tratamento com DNase .....   | <b>35</b>  |
| <b>Tabela 3.</b> Reagentes e concentrações utilizadas para a reação de transcrição reversa de cDNA .....                                  | <b>35</b>  |
| <b>Tabela 4.</b> Condições da reação de transcrição para cDNA .....   | <b>35</b>  |
| <b>Tabela 5.</b> Reagentes e concentrações utilizadas para a reação de PCR em tempo-real.....   | <b>37</b>  |
| <b>Tabela 6.</b> Condições de ciclagem universal para amplificação no aparelho 7500 Real-Time PCR System®<br>.....                        | <b>37</b>  |
| <b>Tabela 7.</b> Eficiência e valores de <i>Slope</i> e $R^2$ dos <i>primers</i> utilizados para PCR real-time. ....                      | <b>38</b>  |
| <b>Tabela A.</b> Estabilidade da expressão dos genes endógenos de acordo com a idade dentro de um mesmo órgão .....                       | <b>106</b> |
| <b>Tabela B.</b> Estabilidade da expressão dos genes endógenos entre o timo e os diferentes órgãos de idades equivalentes (60 dias). .... | <b>107</b> |
| <b>Tabela C.</b> Estabilidade da expressão dos genes endógenos entre os animais C57BL/6 e BALB/c .....                                    | <b>108</b> |
| <b>Tabela D.</b> Variáveis estatísticas dos perfis de expressão gênica analisados pelo teste one-way ANOVA – Comparação Bonferroni .....  | <b>113</b> |



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Antígeno Leucocitário Humano-G                                   | 3         |
| 1.2. Antígeno Leucocitário Humano-E                                   | 5         |
| 1.3. O correspondente murino funcional do HLA-G e HLA-E               | 6         |
| 1.3.1. Genes de classe I do MHC murino                                | 7         |
| 1.3.2. Qa-2: o homólogo murino funcional do HLA-G                     | 8         |
| 1.3.3. O gene <i>H2-Q10</i>   | 13        |
| 1.3.4. Qa-1: homólogo murino funcional do HLA-E                       | 14        |
| 1.4. Tolerância imunológica   | 17        |
| 1.4.1. O timo: indução da tolerância central                          | 17        |
| 1.4.2. O gene <i>Aire</i>   | 19        |
| <b>2. HIPÓTESE</b>  | <b>23</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b>   | <b>25</b> |
| 3.1. Objetivos gerais   | 26        |
| 3.2. Objetivos específicos  | 26        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>27</b> |
| 4.1. Linhagens isogênicas de camundongos                              | 28        |
| 4.2. Determinação das idades fetais                                   | 29        |
| 4.3. Remoção dos órgãos   | 31        |
| 4.4. Extração do RNA total  | 35        |
| 4.5. Quantificação do RNA total                                       | 33        |
| 4.6. Eletroforese de RNA total em gel denaturante                     | 33        |
| 4.7. Tratamento das amostras de RNA e Síntese de cDNA                 | 34        |
| 4.8. Realização da PCR em tempo real ( <i>real time – PCR</i> )       | 36        |
| 4.9. Análise Estatística  | 39        |
| <b>5. RESULTADOS</b>  | <b>40</b> |
| 5.1. Características morfológicas do desenvolvimento fetal            | 41        |
| 5.2. Análise da integridade das amostras de RNA total                 | 42        |
| 5.3. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real                | 43        |
| 5.3.1. Perfis de expressão gênica ao longo do desenvolvimento do Timo | 44        |
| 5.3.2. Perfis de expressão gênica no Baço                             | 48        |
| 5.3.3. Perfis de expressão gênica no Fígado                           | 51        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.3.4. Perfis de expressão gênica no Intestino .....                           | 55         |
| 5.3.5. Perfis de expressão gênica na placenta .....                            | 59         |
| 5.3.6. Perfis de expressão gênica no cérebro .....                             | 62         |
| 5.3.7. Quantificação da expressão gênica relativa entre os órgãos.....         | 63         |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....  | <b>68</b>  |
| 6.1. Perfis de expressão gênica no timo .....                                  | 69         |
| 6.2. Perfis de expressão gênica em órgãos linfóides periféricos.....           | 78         |
| 6.3. Perfis de expressão gênica em sítios imunologicamente privilegiados ..... | 88         |
| <b>7. SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÕES</b> .....                             | <b>93</b>  |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                     | <b>96</b>  |
| <b>9. APÊNDICES</b> .....  | <b>106</b> |
| <b>10. ANEXOS</b> .....  | <b>116</b> |

# Introdução

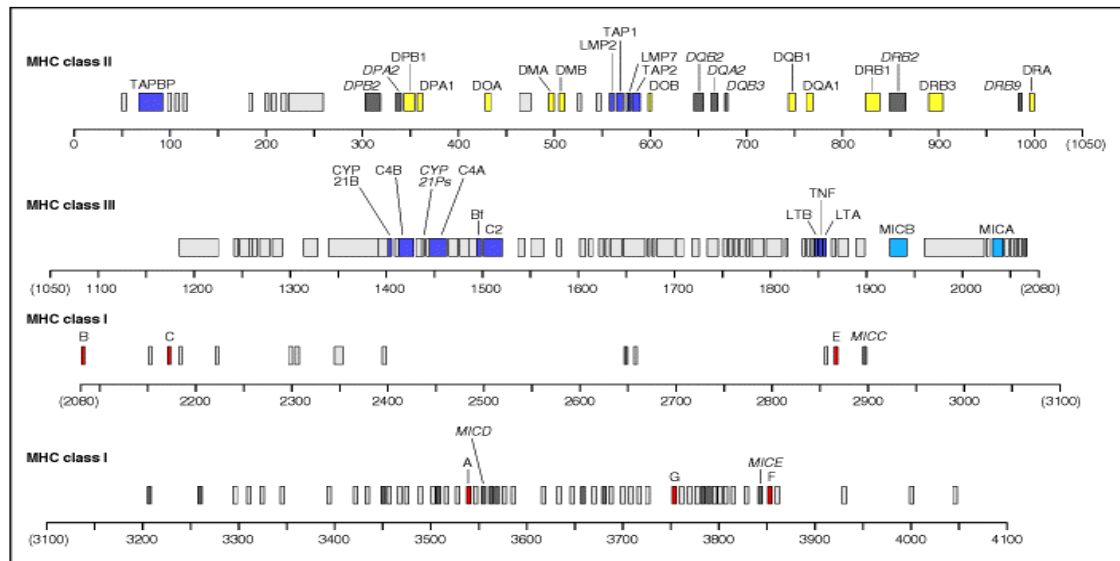
O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – do inglês, *major histocompatibility complex*) foi inicialmente descrito durante a década de 40 através da observação dos processos de rejeição/aceitação de transplantes de tecidos entre camundongos alogênicos ou singênicos, respectivamente <sup>[1]</sup>. Essa região, localizada no cromossomo 17 em camundongos, foi primeiramente denominada de Antígeno II e, posteriormente, de região de Histocompatibilidade-2 (H-2) <sup>[2]</sup>. Em humanos, a região equivalente a H-2 dos camundongos localiza-se no braço curto do cromossomo 6, sendo denominada Antígeno Leucocitário Humano (HLA – *human histocompatibility leukocyte antigen*) <sup>[3, 4]</sup>.

Os genes do MHC foram definidos originalmente com base no mapeamento dos loci que continham os principais genes determinantes da rejeição contra enxertos, sendo reconhecidos os genes de classe I e classe II, respectivamente, codificando proteínas homólogas, mas estruturalmente diferentes <sup>[5, 6]</sup>, **Figura 1**. A região de classe II possui genes que codificam as moléculas de classe II, expressas normalmente em células apresentadoras de antígenos, tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans e linfócitos B. Essas moléculas estão envolvidas na apresentação de peptídeos de origem extracelular para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> <sup>[11, 12]</sup>.

Ao contrário da região de classe II, a região de classe III não possui um extenso polimorfismo; seus genes estão relacionados à codificação de componentes do complemento, tais como C2, C4 e Fator B, dois membros de 70 kDa da família das proteínas do choque térmico (*heat-shock protein* -hsp70) e citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), linfotóxina- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) e linfotóxina- $\beta$  (LT- $\beta$ ) <sup>[13]</sup>

A região de classe Ia do MHC humano codifica as moléculas expressas praticamente em todas as células nucleadas em níveis variáveis de expressão e fazem apresentação de antígenos intracelulares aos linfócitos T citotóxicos (TCD8<sup>+</sup>) <sup>[6, 7]</sup>.

Em humanos, os loci de classe I conhecidos como não-clássicos (classe Ib), são constituídos pelos genes *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* <sup>[8]</sup>. Esses genes são bem menos polimórficos do que os genes HLA de classe I clássicos (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e codificam as moléculas com distribuição tecidual restrita. Além disso, as moléculas de classe Ib não possuem função de apresentação de antígenos. Seu papel vem sendo associado com a regulação da resposta imune <sup>[10]</sup>.



**Figura 1.** Mapa do MHC humano. A organização das regiões de classe I, II e III é mostrada com aproximações de distâncias gênicas dadas em milhares de pares de bases (Kb) <sup>[121]</sup>.

### 1.1. ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO - G

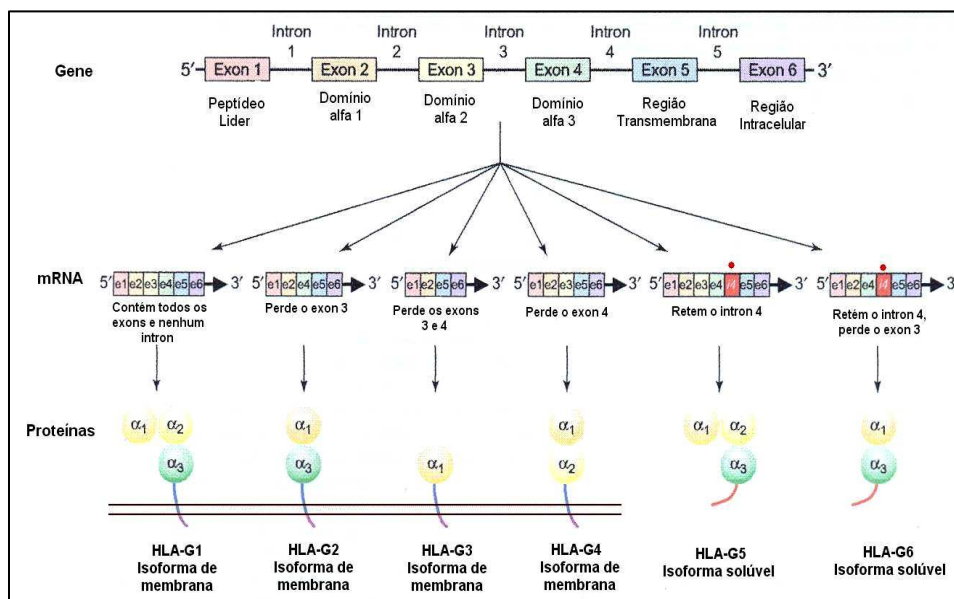
O HLA-G é uma glicoproteína codificada pelo complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) de classe Ib <sup>[14, 15]</sup>. O gene foi primeiramente identificado em 1987 <sup>[16]</sup>, porém o seu reconhecimento só ocorreu em 1990 <sup>[17]</sup>.

O gene *HLA-G* está localizado em posição telomérica ao *HLA-A* e sua estrutura gênica é idêntica aos HLAs de classe I clássicos, os quais são compostos de oito éxons, sete íntrons e uma região não traduzida 3' (3'-UTR, 3'- *untranslated*) <sup>[15]</sup>. Além de sua restrita expressão, a molécula HLA-G se distingue das moléculas clássicas la por seu limitado polimorfismo; cerca de 44 alelos, sendo que dois deles foram recentemente descritos pelo nosso grupo de pesquisa <sup>[18, 19]</sup>. Esses alelos dão origem a múltiplas isoformas através da edição alternativa a partir de um único transcrito primário do mRNA (RNA mensageiro), gerando 4 proteínas de membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e 3 proteínas solúveis (HLA-G5, -G6 e -G7) <sup>[20, 21, 22]</sup>, **Figura 2.**

O nível de expressão de HLA-G pode variar segundo os sítios polimórficos descritos para esse loco, de forma geral, a expressão de moléculas de HLA-G é observada de maneira constitutiva em subpopulações de células do citotrofoblasto, em tecidos coriônicos e na

córnea [25, 26, 27, 28], em células tímicas [29,49], em precursores eritróides e endoteliais [30], no compartimento endócrino do pâncreas humano [31] e em células-tronco mesenquimais (MSC – *mesenchymal stem cell*) do fígado fetal e da medula óssea [32]. A expressão do HLA-G pode ser induzida por certo número de citocinas e hormônios produzidos durante a gravidez ou presentes no microambiente inflamatório (como: GM-CSF [33], IL-10 [34], IFN [35], glicocorticóides [36, 37], progesterona [38], TNF [39]).

Essa expressão pode ainda ser alterada sob algumas condições patológicas, tais como transplantes, doenças autoimunes, inflamatórias, câncer e infecções virais. A expressão de HLA-G por tecidos transplantados pode favorecer a sobrevivência do enxerto e a ausência de sua expressão está associada com maior agressividade de algumas doenças autoimunes e inflamatórias [15, 23].



**Figura 2.** Características das proteínas HLA-G solúveis e de membrana geradas por edição alternativa do mRNA [24].

O HLA-G tem sido considerado “molécula HLA de tolerância”, inibindo as atividades citolíticas de células NK e de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>. Embora os mecanismos pelos quais HLA-G participa do controle da resposta imune não estejam totalmente elucidados, sabe-se que a ligação dessa molécula inibe a ação das células NK [40], o processo de adesão vascular transendotelial, além de inibir a ação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> antígeno-específicos, pela indução de apoptose [41]. Além disso, a ligação de HLA-G com receptores específicos pode levar a

inibição da proliferação de células TCD4<sup>+</sup> [24], promover a polarização da resposta imune para um perfil Th2 (*T-helper type 2*) [42] e induzir células supressoras circulantes, caracterizadas fenotipicamente e funcionalmente como CD3<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> [42, 43].

Essas células exercem sua função imunossupressora sobre outros linfócitos T através da produção de fatores solúveis como a IL-10 e TGF-β [44]. Além disso, aparentemente, a síntese de HLA-G5 por MSCs humanas promove tanto inibição das funções de células T e NK como a expansão de células T regulatórias de fenótipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> [45].

As funções inibitórias realizadas pelo HLA-G ocorrem pela interação dessa molécula com pelo menos três receptores que possuem motivos intracelulares inibitórios (ITIM - *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) presentes nas superfícies de células imunocompetentes: ILT-2 (*Ig-like transcript 2*) em sub-populações de linfócitos T e células NK, monócitos/macrófagos, linfócitos B, células dendríticas; ILT-4 (*Ig-like transcript 4*) em monócitos/macrófagos, células dendríticas; e p49/KIR2DL4 (*killer immunoglobulin-like, 2 domain long 4*) em células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, sendo que KIR2DL4 é um receptor específico para HLA-G [46, 47, 48].

No timo humano, foi demonstrado que o HLA-G1 é altamente expresso na membrana das células epiteliais tímicas medulares (mTECs – *medullary thymic epithelial cells*), em células estromais tímicas da junção córtico-medular e na região subcapsular do timo. Além disso, a isoforma solúvel HLA-G5 é altamente encontrada dentro do compartimento medular do timo [49]. Os processos de indução da tolerância central e seleção do repertório de timócitos ocorrem no timo e garantem a formação de linfócitos T funcionais restritos ao MHC-próprios e tolerantes às proteínas próprias [60].

## 1.2. ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO-E

Diferentemente da molécula de HLA-G, a expressão e função de HLA-E em processos fisiológicos e patológicos permanecem pouco estabelecidos. HLA-E é expresso de forma constitutiva em linfócitos T e B, em células NK, células endoteliais, macrófagos e no timo [50, 55]. A expressão dessa molécula na membrana celular requer a disponibilidade de peptídeos conservados derivados da seqüência líder de algumas moléculas HLA de classe I,

incluindo, HLA-A, -B, -C e -G [51, 52, 53]. Ainda, HLA-E pode ser encontrado também na forma solúvel (sHLA-E) e sua expressão pode ser induzida por algumas citocinas, como INF- $\gamma$  e IL-10 [50, 54]

HLA-E tem sido identificado como um ligante para os receptores CD94/NKG2A e CD94/NKG2C expressos em células NK e em células T CD8<sup>+</sup> [51, 53, 56]. A interação do HLA-E com peptídeos de seqüências líderes, provenientes de moléculas clássicas de HLA de classe I, interagem com o receptor inibitório (CD94/NKG2A) presente na célula NK, resultando na inibição da lise mediada por essas células [51, 53, 55]. De forma semelhante, complexos formados pela ligação do HLA-E a peptídeos de seqüências líderes podem interagir diretamente com células TCD8<sup>+</sup>, fornecendo vias de proteção e regulação da função dessas células [55].

A importância definitiva da molécula de HLA-E na regulação da resposta imune foi obtida através da construção de animais deficientes de Qa1, seu homólogo murino funcional [57]. Esses animais apresentaram defeitos na imunoregulação mediada por linfócitos TCD8<sup>+</sup>, levantando evidências acerca do envolvimento de células T CD8<sup>+</sup> supressoras restritas à expressão de HLA-E/Qa-1 na modulação das respostas imunes [57, 58, 59].

### 1.3. O CORRESPONDENTE MURINO FUNCIONAL DO HLA-G E HLA-E

Em murinos, duas moléculas são descritas como sendo os homólogos funcionais do HLA-G e HLA-E de humanos: Qa-2 e Qa-1, respectivamente. Semelhantemente aos humanos, Qa-2 e Qa-1 são moléculas de classe Ib do MHC que possuem pouco polimorfismo e expressão tecidual limitada [61, 62, 63]. São codificadas por genes localizados na sub-região *H2-Q* e *H2-T* do complexo de histocompatibilidade-2 e possuem homologia estrutural em cerca de 80 a 85% com os correspondentes no humano [64, 65].

Sabe-se que o número de genes da classe I do MHC, sua organização, características estruturais, seus padrões e níveis de expressão, apesar de semelhantes, variam de espécie para espécie. Assim, tem-se observado uma extensa dificuldade no estabelecimento de relações ortólogas, ou seja, relações de ancestralidade gênica comum entre os genes de classe I isolados de diferentes organismos [65]. A dificuldade em se encontrar relações



ortólogas implica no estabelecimento de relações de homologia funcional como sendo o padrão na comparação gênica <sup>[64]</sup>.

Estima-se que 80% dos genes de camundongos possuem um ortólogo humano restrito, entretanto, aparentemente, ainda não se conhece nenhuma relação de ortologia entre os genes de classe I do MHC humano e murino <sup>[65, 66]</sup>. Desse modo, a procura por homólogos murinos funcionais de moléculas como o HLA-G e o HLA-E requer que os candidatos sejam suficientemente similares em estrutura, desempenhem funções semelhantes, e que possam mediar processos intra e intercelulares equivalentes <sup>[67]</sup>.

### 1.3.1. GENES DE CLASSE I DO MHC MURINO

O complexo murino *H2* localiza-se no cromossomo 17 e cobre cerca de 4 Mpb (mega pares de bases). Esse complexo é tradicionalmente dividido em três regiões de acordo com seu conteúdo gênico, designado como classes I, II e III. No camundongo, os genes de classe I do MHC são divididos em 5 subregiões: *K*, *D*, *Q*, *T* e *M*, de acordo com as posições que ocupam no cromossomo 17. Os loci *H2-K* e *D* codificam as moléculas clássicas do MHC murino, já os loci *H2-Q*, *-T* e *-M* codificam moléculas não-clássicas. Esses genes, assim como nos humanos, são geralmente caracterizados por possuir padrão de expressão limitada a determinados tecidos, baixo polimorfismo e produtos com funções ainda pouco conhecidas <sup>[61, 65]</sup>.

A sub-região *H2-Q* localiza-se em posição telomérica aos genes de classe II e III do MHC murino. É composta por um grupo de dez genes *Q1* a *Q10*, cuja expressão varia de acordo com as diferentes linhagens de camundongos <sup>[61]</sup>. Alguns estudos têm demonstrado que em camundongos da linhagem C57BL/6, os genes *Q4*, *Q6*, *Q7*, *Q8*, *Q9*, *Q10* codificam proteínas que podem estar envolvidas na modulação das respostas imunes, na apresentação de antígenos e ativação de células T, além de possuírem funções no controle do crescimento e desenvolvimento fetal murino <sup>[61, 64, 68, 69, 70]</sup>.

Uma característica marcante dos genes de classe I da região *Q* está relacionada com o fato de que o elevado nível de polimorfismo, característico dos genes do MHC, não está localizado dentro de cada gene individualmente, mas sim, no número de genes que são encontrados nessa região <sup>[65]</sup>.

Os genes *Q3*, *Q5*, *Q6*, *Q7*, *Q8* e *Q9* são também conhecidos como *gene da pré-implantação e do desenvolvimento embrionário (Ped gene – preimplantation embryo development gene)*. Entretanto, ainda não se tem conhecimento acerca dos produtos protéicos dos genes *Q3* e *Q5*. Por outro lado, os genes *Q6*, *Q7*, *Q8* e *Q9* são genes altamente homólogos, duplicados e codificam a proteína Qa-2<sup>[61, 65]</sup>

Qa-2 (ou Qa2) é uma proteína de 40 kDa encontrada tanto em sua forma associada à membrana quanto em sua forma solúvel secretada. Ambas as conformações carregam os domínios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  associados à cadeia  $\beta_2$ -microglobulina<sup>[61]</sup>. Os domínios da cadeia pesada são codificados pelos quatro genes homólogos, *Q6*, *Q7*, *Q8* e *Q9*, dispostos em *tandem* na região *H2-Q*. Esses genes são agrupados em pares gênicos de acordo com as suas similaridades na seqüência, em: par gênico *H2-Q6/Q8* e par gênico *H2-Q7/Q9*. Existe cerca de 99% de similaridade nas seqüências de nucleotídeos entre os genes de cada par gênico e mais de 93% de similaridade entre os dois pares gênicos<sup>[71]</sup>.

Algumas evidências têm demonstrado que o par gênico *H2-Q7/Q9* é responsável pela expressão da maioria das moléculas Qa-2 presentes na superfície de células imunocompetentes e células embrionárias. Além disso, o produto protéico codificado pelo par gênico *H2-Q6/Q8* foi detectado somente em células transfectadas, se essa molécula é expressa *in vivo*, ocorre em níveis muito baixos para serem detectados<sup>[61, 72, 73]</sup>. Dessa forma, estudos que buscam o melhor entendimento acerca das funções da molécula Qa-2 utilizam como padrão o estudo de moléculas codificadas pelos genes *H2-Q7/Q9*<sup>[61, 67, 71, 72, 75, 86]</sup>. No presente estudo, todas as citações, resultados e informações acerca do Qa-2 são referentes à molécula codificada pelo par gênico *H2-Q7/Q9*.

### 1.3.2. Qa-2: O HOMÓLOGO MURINO FUNCIONAL DO HLA-G

O Qa2 é apontado em vários estudos como sendo o homólogo funcional do HLA-G no camundongo<sup>[61, 67, 75, 76, 77]</sup>. A base para a classificação de Qa-2 e HLA-G como homólogos incluem as suas similaridades de seqüência e estrutura compartilhadas, bem como a sua homologia funcional<sup>[64]</sup>. Além disso, ambas as proteínas possuem papéis imunorregulatórios, estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e são expressas em sítios imunologicamente privilegiados<sup>[61, 64, 75, 76, 77]</sup>. Tanto o HLA-G como o Qa-2 são

proteínas de classe Ib do MHC com estruturas extracelulares altamente homólogas e existentes em isoformas associadas à membrana e solúveis. Em ambas as proteínas, ocorre ausência da cauda citoplasmática, característica das moléculas de MHC de classe Ia [67, 78, 79, 80].

A molécula Qa-2 possui pouco polimorfismo estrutural, entretanto, os seus níveis de expressão variam de acordo com a linhagem murina em que ela é encontrada. Linhagens selvagens ou geradas por cruzamentos podem ser agrupadas de acordo com os níveis de expressão do Qa2 em *high*, *medium*, *low* e *null*, nos quais os níveis de expressão do Qa2 refletem o número de genes que codificam a molécula [64]. Assim, camundongos C57BL/6 são Qa-2<sup>high</sup> já que possuem ambos os pares gênicos *Q6/Q8* e *Q7/Q9*. Animais BALB/c são Qa-2<sup>med</sup>, pois nesses animais ocorre a deleção dos genes *Q8* e *Q9*. Os animais C3H são Qa-2<sup>null</sup>, devido a deleção dos genes *Q6*, *Q7* e *Q8* [61].

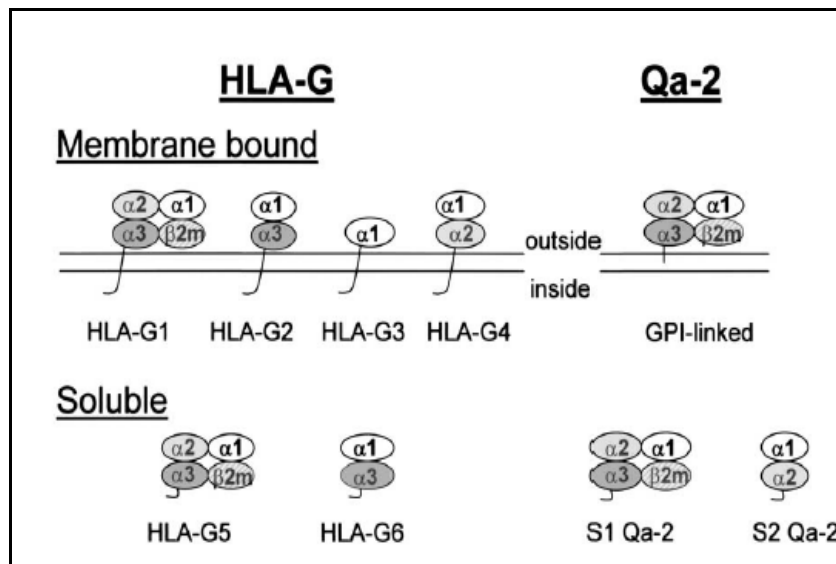
Qa-2 foi descrito primeiramente em 1976, por Flaherty [81]. Essa molécula foi inicialmente detectada em células derivadas de tecidos linfóides como, timócitos, células T maduras, células B, células-tronco hematopoéticas, unidades formadoras de colônia de granulócitos-macrófagos, células-tronco embrionárias multi-potenciais, células dendríticas e células NK [61, 82, 83]. Além de sítios imunologicamente privilegiados como o trofoblasto da placenta, células embrionárias, testículos, na câmara anterior do olho e em folículos pilosos [64, 66, 73]. Em tecidos adultos, a expressão de Qa-2 é amplamente distribuída. Transcritos para as isoformas solúveis e de membrana são expressos ubiquamente, em baixos níveis, em todos os órgãos, com exceção do cérebro [73]. Esse padrão de expressão, incomum para moléculas de classe Ib, está correlacionado com a capacidade dessa molécula em suportar a formação de estrutura convencional de moléculas de classe Ia [64]. Entretanto, em condições normais a concentração de Qa-2 é baixa, variando de 10 a 60 ng/mL e aumentando de acordo com a estimulação do sistema imunológico [61].

Qa-2 está presente em várias células de interesse imunológico, como APCs (*antigen-presenting cells* - células apresentadoras de antígenos) capazes de induzir respostas alogênicas anti-Qa2; em células implicadas com a imunidade de mucosas (células intestinais e em hepatócitos); em células epiteliais tímicas essenciais para a seleção positiva e negativa de células T e em timócitos em desenvolvimento [64]. As células T expressam Qa-2 de forma

mais abundante do que quaisquer outras células no organismo e têm sido usadas largamente em estudos que procuram definir o papel de Qa-2 na resposta imune [64, 84].

Durante o desenvolvimento, Qa-2 é expresso por zigotos e no embrião em fase de pré-implantação. Nesse contexto o gene *H2-Q7/Q9* também é chamado de *Ped gene* (*Gene da preimplantação e desenvolvimento embrionário*). A expressão desse gene proporciona o aumento da taxa de implantação e clivagem embrionária, maior sobrevivência do feto, gestações mais bem sucedidas, além de influenciar no tamanho e peso do animal durante a fase de lactação [72]. De forma semelhante, assim como no humano, a expressão do Qa-2 parece ser um pré-requisito para o estabelecimento de uma gestação de sucesso, protegendo o feto das ações citolíticas de células NK maternas [67, 85].

Tanto Qa-2 quanto HLA-G produzem isoformas solúveis a partir da edição alternativa do RNA primário. A molécula Qa-2 possui duas isoformas solúveis conhecidas, a S1Qa-2 correspondente estruturalmente ao HLA-G5 e S2Qa-2 que não possui o domínio  $\alpha 3$ , correspondendo à molécula solúvel de HLA-G4. A isoforma de membrana do Qa-2 é estruturalmente homóloga à isoforma HLA-G1, entretanto, Qa-2 é ancorada na membrana por uma molécula de GPI (Glicosilfosfatidilinositol) [67], **Figura 3**.



**Figura 3.** Isoformas de Membrana e solúveis do HLA-G e do seu homólogo murino Qa-2. A isoforma S1Qa-2 é estruturalmente similar ao HLA-G5 solúvel, enquanto que S2Qa-2 corresponde ao HLA-G4 [67].

As principais funções da molécula Qa-2 estão relacionadas aos processos de ativação e proliferação de células T. Qa-2 possui a capacidade de se ligar a repertórios de peptídeos nonaméricos derivados de processos intracelulares. O mesmo acontece com a molécula Qa10 e com o HLA-G. Porém, diferentemente dessas moléculas, a expressão de Qa-2 por APCs, aparentemente, pode desencadear respostas imunes mediadas por linfócitos T CD8<sup>+</sup> [61, 64, 70].

Qa-2 tem importante função no controle do crescimento e do desenvolvimento fetal murino, regulando a taxa de divisão celular durante a fase de pré-implantação do embrião. Possivelmente, Qa-2 está relacionado com a proteção do feto pela inibição da lise mediada por células NK maternas [65, 68, 75, 76]. Quanto as suas propriedades imunomodulatórias, Qa-2 atua na regulação das respostas de células NK através da inibição das funções dessas células por interação com receptores ainda não identificados [65, 66, 71]. Qa-2 pode atuar como elemento de restrição para linfócitos T CD8<sup>+</sup>, promovendo lise de células tumorais que o expressem na membrana [84].

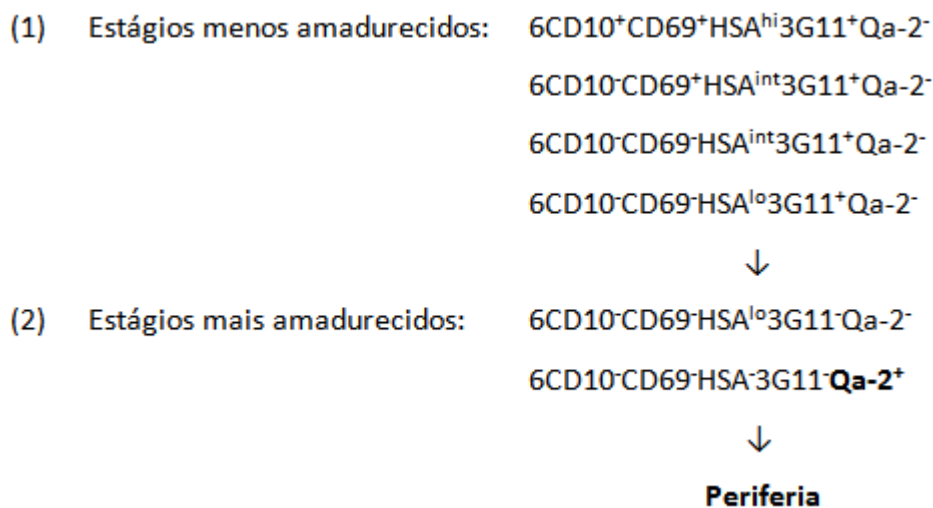
Recentemente, foi mostrado que baixos níveis de Qa-2 estão relacionados com maiores índices de rejeição aguda a aloenxertos, indicando que essa molécula é um potencial marcador preditivo de eventos de rejeição aguda a transplantes [86]. Qa-2 é requerido durante a seleção de células T CD8 $\alpha\alpha$ /TCR $\alpha\beta$  intraepiteliais e está envolvido na regulação dessas células para a manutenção da integridade intestinal [87].

No timo, Qa-2 é expresso constitutivamente e é considerado um marcador de timócitos medulares nos estágios finais de desenvolvimento [64, 74, 88, 89]. Na medula tímica, as populações de timócitos que expressam altos níveis de Qa-2 constituem cerca de 5 a 6% dos timócitos SP (simples positivos) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Entretanto, Qa-2 também é encontrado em subpopulações de timócitos imaturos DN (duplo negativos) CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> [64]. Esse padrão de distribuição seletiva do Qa-2 tem sido utilizado como um critério de identificação de subpopulações de timócitos amadurecidos e funcionalmente competentes [64].

Os timócitos medulares TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> (SP) podem ser divididos em seis diferentes subgrupos baseados na expressão diferencial de alguns marcadores de superfície: **(1)** 6C10<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, **(2)** 6C10<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup>, **(3)** 6C10<sup>-</sup>CD69<sup>-</sup>3G11<sup>+</sup>Qa-2<sup>-</sup>, **(4)** 6C10<sup>-</sup>CD69<sup>-</sup>3G11<sup>+</sup>Qa-2<sup>+</sup>, **(5)** 6C10<sup>-</sup>CD69<sup>-</sup>3G11<sup>-</sup>Qa-2<sup>-</sup>, **(6)** 6C10<sup>-</sup>CD69<sup>-</sup>3G11<sup>-</sup>Qa-2<sup>+</sup>. Nos quais, 6C10 é expresso na passagem

do estágio DN para DP, e CD69 e 3G11, na passagem do estágio DP para SP <sup>[87, 89]</sup>. Os diferentes subgrupos refletem as vias de amadurecimento que os timócitos TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (SP) seguem até o seu completo amadurecimento em linfócitos TCR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> funcionais <sup>[87, 89]</sup>.

De maneira semelhante, timócitos medulares TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> SP formam uma população fenotipicamente e funcionalmente heterogênea dentro da medula tímica. Durante os 15 dias em que essas células residem na medula, elas são submetidas a modulações fenotípicas e funcionais. De acordo com o fenótipo apresentado, os timócitos TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> SP podem ser agrupadas em seis diferentes subpopulações baseadas no ganho e na perda da expressão de alguns marcadores de superfície <sup>[88]</sup>. De forma geral, a aquisição do amadurecimento fenotípico e funcional, provavelmente, segue o seguinte padrão:



Aparentemente, os timócitos medulares CD8<sup>+</sup> SP que expressam Qa-2 na membrana, representam a população de células fenotipicamente e funcionalmente mais amadurecida, já que a aquisição da atividade proteolítica da granzima A e a resistência à morte celular induzida por cortisona, só ocorre nas subpopulações de timócitos em que o Qa-2 é observado <sup>[88]</sup>.

De forma geral, o amadurecimento funcional dos timócitos SP CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> é acompanhado pela perda na expressão de CD69, um marcador de ativação expresso de forma transiente durante a passagem do estágio de DP (duplo positivo) para SP, e a aquisição na expressão de Qa-2. Acredita-se, portanto, que o ganho na expressão do Qa-2 é

necessário para a migração dessas células para a periferia e para os processos de proliferação, produção de citocinas e atividade citolítica [74, 88, 89].

### 1.3.3. O GENE *H2-Q10*

Outro gene não-clássico do MHC de classe I localizado dentro da sub-região *H2-Q* e com possível envolvimento na modulação do sistema imune é o *H2-Q10*. Este gene se encontra na porção mais distal da sub-região Q do complexo H-2 murino e possui homologia de cerca de mais de 80% com as moléculas clássicas *H2-K*, *H2-D* e *L*. *H2-Q10* possui duas características marcantes dos genes de classe Ib: é um gene altamente conservado, com cerca de mais de 99,4% de homologia entre os diferentes alelos e possui uma expressão tecidual distinta, aparentemente, restrita a células do fígado [90].

*H2-Q10* codifica a molécula Qa10. Essa molécula se encontra associada a  $\beta$ 2-microglobulina e possui cerca de 38-40 kDa. Qa10 foi a primeira molécula não-clássica do MHC de classe I a ser detectada como isoforma solúvel presente na circulação. Ela é altamente detectável no soro sob a forma de complexos multivalentes de alto peso molecular, cerca de 200-300 kDa, e em concentrações que variam de 20 a 60  $\mu$ g/mL, dependendo da linhagem do animal [90, 91]. Em algumas linhagens, como em BALB/c, os níveis são maiores em machos do que em fêmeas. Esses níveis aumentam com o ganho de idade pelo animal, diminuem durante a gestação e não se alteram frente à estimulação antigênica [91].

A propriedade de Qa10 em ser secretada, ao invés de estar associada à membrana, se deve à porção C-terminal particular dessa molécula, resultante da deleção de 13 bases nucleotídicas e de múltiplas substituições de nucleotídeos no éxon 5. Essas alterações dão origem a um códon de terminação prematuro, que nessa molécula é 47 aminoácidos mais curto do que outras moléculas clássicas do MHC de classe I [91].

Qa10 é sintetizado em níveis elevados pelas células parenquimatosas do fígado, embora tenham sido encontrados traços de expressão nos rins e no estômago [92]. Qa10 possui motivos de ligação típicos de moléculas clássicas do MHC de classe I e se associa a peptídeos que se ligam comumente a essas moléculas, sendo facilmente reconhecidas por um variado número de células T CD8<sup>+</sup>. Muitos dos ligantes de Qa10 são octâmeros derivados

do processamento de proteínas intracelulares como, subunidades do proteossoma, riboforina, citocromo c oxidase e peptídeos provenientes do TCR V $\beta$  [90].

As suas funções ainda não estão bem estabelecidas. Entretanto, tem-se sugerido que essa molécula poderia estar envolvida em eventos de tolerância imunológica, podendo estar envolvida na melhor aceitação de aloenxertos hepáticos. [91].

Tem sido relatado que em algumas espécies de animais, o transplante de fígado é muito mais tolerizável do que o de outros órgãos, como pele, coração e rins. Aparentemente, esse estado de tolerância é acompanhado pela deleção ou inativação funcional de células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas após ligação-cruzada com moléculas de classe I do MHC presentes no aloenxerto. É possível que a presença de Qa10 na circulação e em células do aloenxerto sirva como um indutor de tolerância e também possa estar envolvido com a relativa ausência de imunogenicidade a transplantes hepáticos [93].

#### 1.3.4. Qa-1: HOMÓLOGO MURINO FUNCIONAL DO HLA-E

Assim como o Qa-2, a molécula Qa-1 é uma molécula não-clássica do MHC de classe I [94, 95]. Qa-1 é codificado pelo gene *H2-T23*, localizado na região *T* do complexo *H2* murino e tem sido considerado um dos genes de classe Ib do MHC menos polimórfico [95]. Análises iniciais do polimorfismo de Qa-1 têm reconhecido que as variações identificadas não são relativas a verdadeiros alelos genéticos, mas sim, a pseudoalelos que surgiram por eventos de duplicação de blocos genéticos na região *H2-T* murina [95]. Somente quatro alelos têm sido identificados em termos moleculares e sorológicos e, apesar das fortes similaridades de seqüência entre todas as moléculas Qa-1, é sugerido a classificação dessas moléculas em duas famílias: Qa-1<sup>a</sup>-like e Qa-1<sup>b</sup>-like [95].

As moléculas Qa-1<sup>b</sup>-like são codificadas por alelos do locus *H2-T23* e correspondem a 75 % de todas as moléculas Qa-1 encontradas em camundongos. Moléculas Qa-1<sup>a</sup>-like são codificadas por alelos do locus *H2-Q1*. As diferenças estruturais entre as moléculas das famílias Qa-1<sup>a</sup>-like e Qa-1<sup>b</sup>-like giram em torno de 5 a 8% em termos de seqüências de aminoácidos, enquanto que os membros dentro da mesma família diferem em menos de 2,0% [95]. Embora *H2-T23* seja conhecido por codificar a maioria das proteínas Qa-1, os outros alelos e moléculas Qa-1<sup>a</sup> ainda não foram completamente caracterizados [95].



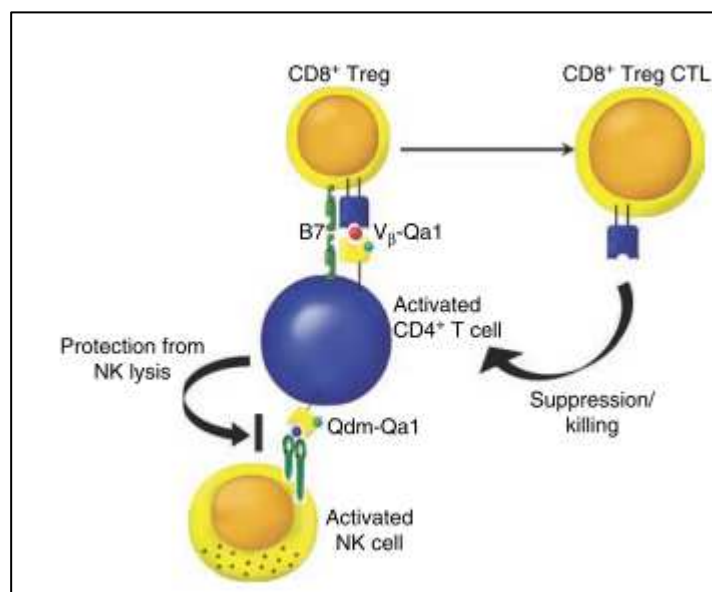
Vários estudos apontam o Qa-1 como sendo o homólogo murino funcional do HLA-E [59, 94, 95, 96, 97, 98, 99]. Qa-1 é uma glicoproteína de membrana com 48 kDa e é expressa em associação com a molécula da  $\beta$ 2-microglobulina. Embora o mRNA de Qa-1 possa ser detectado ubiquamente em vários tecidos, a expressão da proteína é consideravelmente mais restrita e limitada a células hematopoéticas ativadas como, células T, células dendríticas, macrófagos e células B [94]. Assim como o HLA-E, o Qa-1 interage com peptídeos compostos de 9 aminoácidos derivados das sequências sinais de moléculas clássicas do MHC, denominado de Qdm, ou determinante modificador de Qa-1 [94].

As principais funções do Qa-1 estão relacionadas com apresentação de um repertório limitado de peptídeos a diferentes tipos de células  $\text{TCR}\alpha\beta/\gamma\delta$   $\text{CD8}^+$ , NK-T e células NK. Qa-1 pode apresentar antígenos endógenos ou exógenos gerados por vias que podem ser dependentes ou independentes de TAP (*transporter associated with antigen processing* – transportador associado ao processamento antigênico) [94]. Os principais peptídeos relatados como ligantes para Qa-1 incluem o Qdm, *hsp60* de *Mycobacterium bovis*, sequências líderes da insulina, *Salmonella* GroEL e peptídeos derivados do  $\text{TCRV}\beta$  [94, 95, 97]. A apresentação de antígenos pelo Qa-1 pode estimular a produção de citocinas envolvidas diretamente na resposta inata e direcionar a resposta imune a determinados tipos de patógenos [95].

Qa-1 está intimamente envolvido com a inibição das ações citolíticas de células NK e células  $\text{TCD8}^+$  através da ligação com receptores de lectina do tipo C, como CD94/NKG2 presente em células NK, NK-T e em células  $\text{TCD8}^+$ . Essas interações são peptídeo-dependentes e necessitam da associação do Qa-1 com o Qdm. O resultado da ligação de Qa-1 com receptores CD94/NKG2 pode ser a geração de sinais estimulatórios ou inibitórios, dependendo do membro da família NKG2 que é envolvida [94, 98]. De forma geral, a ligação do Qa-1 com CD94/NKG2A ou B resulta em sinais inibitórios que podem cessar a atividade de células NK ou células  $\text{TCD8}^+$ . Já o envolvimento de CD94/NKG2C, E ou H pode gerar sinais estimulatórios que aumentam a atividade citotóxica dessas células. A interação do Qa-1/Qdm com os receptores NKG2 é um processo dinâmico e NKG2A exerce efeito inibitório dominante [94].

Qa-1 está envolvido na regulação das respostas imunes e na autoimunidade através da modulação da ação de células T  $\text{CD4}^+$  autorreativas e de células B por mecanismos de supressão mediados por células  $\text{TCD8}^+$  regulatórias (Tregs  $\text{CD8}^+$ ). Evidências têm mostrado

que as células Tregs CD8<sup>+</sup> suprimem a resposta de células T CD4<sup>+</sup> e células B ativadas através da interação dependente da expressão de Qa-1 nessas células [59, 94, 96, 97,98]. A presença de Qa-1 é essencial para função imunossupressora de células Tregs CD8<sup>+</sup> pois é através do reconhecimento do antígeno apresentado via Qa-1 nas células-alvo que as células Tregs CD8<sup>+</sup> desempenham a sua função [59, 94]. Essas células, após reconhecimento de antígenos derivados do TCRvβ de clones de células T CD4<sup>+</sup> autorreativas, apresentado via Qa-1, são estimuladas a realizar lise dependente de perforina e a produzir citocinas imunomodulatórias como TGF-β e IL-10 e controlar a ação das células-alvo [94, 97, 98].



**Figura 4:** Regulação das respostas de células T CD4<sup>+</sup> por células T CD8<sup>+</sup> reguladoras e por células NK através do envolvimento de moléculas Qa-1 [94].

De forma geral, a expressão de Qa-1/Qdm dependente de processamento antigênico mediado pela TAP, interage com receptores CD94/NKG2A nas células NK e pode proteger as células T CD4<sup>+</sup> ou células-alvo da lise mediada por células NK. Alternativamente, a expressão de Qa-1 associado a peptídeos derivados de proteínas endógenas de células T CD4<sup>+</sup> geradas por mecanismos independentes de TAP, pode interagir com TCRs em células T CD8<sup>+</sup> restritas ao Qa-1, levando à expansão e diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> reguladoras que suprimem a ativação de células T CD4<sup>+</sup> [94], **Figura 4.**

Outras evidências apontam o envolvimento do Qa-1 na manutenção do privilégio imunológico da retina [100], na expansão de células T reguladoras CD8αα<sup>+</sup> TCRαβ nos órgãos

linfóides <sup>[97]</sup> e na regulação da tolerância periférica pelo reconhecimento de proteínas próprias e não-próprias baseadas na avidéz de interação do Qa-1 com TCRs específicos <sup>[99]</sup>.

No timo, foi visto que ocorre a seleção positiva de células T CD8<sup>+</sup> restritas ao Qa-1. <sup>[94, 95]</sup>. Esta seleção, aparentemente, é independente do peptídeo dominante Qdm associado ao Qa-1 e, ao contrário da seleção de células restritas as moléculas de classe I convencionais, a apresentação do ligante e a expressão de Qa-1 somente por células hematopoéticas é suficiente para a seleção positiva. A seleção no timo de células TCD8<sup>+</sup> regulatórias dependentes de Qa-1, pode permitir a expansão de células TCD8<sup>+</sup> regulatórias nos órgãos linfóides periféricos e os mecanismos de inibição dependentes de Qa-1 realizado por essas células, combinado com os processos de seleção negativa, representam elementos-chave na manutenção da autotolerância. <sup>[94, 95, 98]</sup>.

#### 1.4. TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

A tolerância imunológica, ou autotolerância, envolve todos os mecanismos que previnem e protegem o indivíduo contra respostas imunes realizadas pelo seu próprio sistema imunológico. Assim, esse fenômeno pode ser definido como a não-responsividade dos linfócitos T e B aos antígenos próprios (autoantígenos) <sup>[60, 101]</sup>.

Os mecanismos de indução da tolerância imunológica podem ser agrupados em central e periférica, de acordo com os locais onde são impostos. O principal processo atuante na tolerância central é a seleção negativa de timócitos que compreende a morte induzida pela interação de alta afinidade/avidéz entre os TCRs (*T-cell receptor* – Receptor de célula T) e autoantígenos durante o desenvolvimento dos timócitos. O processo de seleção negativa de timócitos é um fenômeno realizado pelas células epiteliais tímicas medulares (mTECs – *medullary thymic epithelial cells*) sob a ação do gene *Aire* (*autoimmune regulator*) <sup>[60, 103]</sup>.

##### 1.4.1. O TIMO: INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA CENTRAL

O fenômeno da tolerância central aos antígenos próprios envolve os processos de seleção negativa e positiva dos linfócitos T que se desenvolvem no estroma tímico. O timo é

um órgão linfóide primário, local onde os precursores de células T, os timócitos, são submetidos a processos complexos de maturação e adquirem competência fenotípica e funcional<sup>[102]</sup>.

Em camundongos, o timo inicialmente se desenvolve a partir de estruturas bilaterais da terceira bolsa faríngea do intestino primário embrionário<sup>[105, 106]</sup> e são colonizados por progenitores hematopoéticos por volta do 11º dia do desenvolvimento embrionário (E11.5)<sup>[107]</sup>. Já o fenômeno de involução alométrica do timo se inicia pouco antes do nascimento e a involução absoluta ocorre na puberdade com a substituição do estroma tímico por tecido adiposo. Entretanto, o timo adulto continua a receber células precursoras, vindas da medula óssea, lançando emigrantes tímicos para a periferia<sup>[107, 108]</sup>.

Os processos de maturação dos linfócitos consistem em uma complexa seqüência de eventos biológicos, que compreendem a proliferação das linhagens celulares precursoras, a expressão diferencial de proteínas de membrana, rearranjos gênicos do receptor de células T, a seleção do repertório de linfócitos maduros e conseqüente morte celular programada dos linfócitos não selecionados e finalmente a migração celular para a periferia. Durante cada um desses estágios, as células sofrem significativas mudanças celulares e genéticas<sup>[103, 109]</sup>.

O timo fornece o microambiente especializado para que ocorra o desenvolvimento dos precursores de células T. Esse microambiente é formado por células de origem linfóide (células dendríticas, macrófagos, células B, timócitos) e não-linfóide (células epiteliais, corpúsculos de Hassal) e pelos componentes da matriz extracelular (ECM)<sup>[103]</sup>. As células epiteliais tímicas, corticais e medulares são os componentes celulares principais do microambiente tímico. Elas compõem os dois principais compartimentos do timo, o córtex e a medula e influenciam diversos aspectos da diferenciação dos timócitos, das vias de interações célula-célula e das secreções de fatores solúveis, tais como citocinas e hormônios tímicos: timulina (*thymulin*), timopoetina (*thymopoietin*) e timosina- $\alpha 1$  (*thymosin- $\alpha 1$* )<sup>[111]</sup>.

Os sinais derivados das cTECs regulam a seleção positiva dos timócitos que reconhecem os complexos MHC-peptídeos próprios, enquanto que as mTECs promovem a seleção negativa de timócitos autorreativos, garantindo a manutenção da tolerância aos antígenos próprios<sup>[104]</sup>. De forma geral, a seleção positiva é o processo no qual os timócitos DP corticais que apresentam TCRs funcionais na superfície, se ligam com baixa

avidéz/afinidade ao complexo peptídeo – MHC próprio e recebem estímulos para a manutenção da sua sobrevivência. Os timócitos cujos receptores não reconhecem as moléculas de MHC próprias morrem por negligência. Durante esse processo, também ocorre a restrição de moléculas de classe I ou de classe II do MHC com os subtipos de linfócitos T, assegurando que as células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas sejam específicas a peptídeos expostos pelas moléculas de MHC de classe I, enquanto que as células T CD4<sup>+</sup> auxiliares ligam-se a moléculas de MHC de classe II associadas ao peptídeo <sup>[103, 107, 110]</sup>.

Diferentemente, a seleção negativa é a eliminação por apoptose dos timócitos cujos TCRs ligam-se com alta avidéz/afinidade aos antígenos próprios apresentados pelo MHC presentes em mTECs e em células dendríticas no timo. Este processo é realizado principalmente pelas mTECs e elimina as células T em desenvolvimento que são fortemente reativas contra antígenos próprios <sup>[112]</sup>. A principal característica dessas células, entretanto, é a realização do fenômeno conhecido como *Expressão Gênica Promíscua (Promiscuous Gene Expression-PGE)*. Esse fenômeno se caracteriza como uma propriedade fisiológica das mTECs em expressar conjuntos de milhares de genes que codificam antígenos específicos de determinados tecidos e órgãos (TRAs – *Tissue-related antigens*) do corpo <sup>[113, 114, 116, 117]</sup>. A expressão de um conjunto de milhares de TRAs representa uma característica essencial para a representação do próprio no timo e garante a exposição da maioria, senão de todos os órgãos do organismo <sup>[115]</sup>. A manutenção desse fenômeno é regulada através da ação do gene *Aire (Autoimmune regulator gene)* expresso em algumas subpopulações de mTECs <sup>[60]</sup>.

#### 1.4.2. O GENE AIRE

Desde sua descoberta como um regulador transcricional envolvido no controle da expressão de milhares de genes dentro do timo, Aire tem modificado significativamente as bases das teorias acerca da tolerância imunológica <sup>[60]</sup>. O gene *Aire* foi identificado primeiramente em 1997, devido a sua incomum ligação a uma doença autoimune monogênica, denominada de APECED (Síndrome da poliendocrinopatia-candidíase ectodermal distrofia autoimune). Os indivíduos acometidos dessa doença desenvolvem um severo e complexo conjunto de sintomas, caracterizado por insuficiência das glândulas

adrenais e paratireóides, candidíase e outras endocrinopatias como, diabetes do tipo 1, hipogonadismo e hipotireoidismo <sup>[117]</sup>.

Aire é expresso preferencialmente em órgãos linfóides, particularmente no timo em subpopulações de mTECs. Outras células tímicas como células dendríticas e macrófagos intra-tímicos expressam Aire, porém, em menores níveis <sup>[60]</sup>. Além disso, trabalhos recentes têm demonstrado a expressão de Aire por células estromais de órgãos linfóides periféricos, como o baço, linfonodos e as placas de Peyer. Nesses órgãos, assim como na medula tímica, o gene *Aire* promoveria a realização da PGE, sugerindo sua participação também na indução de tolerância periférica a autoantígenos <sup>[119]</sup>.

A transcrição de milhares de TRAs no timo permite que as células T em desenvolvimento entrem em contato direto com um grande conjunto de antígenos próprios durante o seu desenvolvimento. Assim, uma vez que essas células atinjam a maturidade e migrem para a periferia do corpo, elas serão tolerantes aos antígenos aos quais foram apresentadas <sup>[119]</sup>. Atualmente sabe-se que a maioria dos genes que codificam TRAs e que são expressos de forma promíscua no timo é regulada pelo produto de um único gene *Aire*. Assim, a principal implicação da PGE regulada pelo *Aire* é a manutenção da homeostase imunológica no corpo, controlando as reações autoimunes potencialmente patogênicas <sup>[110]</sup>.

Algumas evidências apontam que esta molécula atua como um regulador transcricional: Aire possui diversos domínios funcionais que são característicos de proteínas nucleares e a fatores de transcrição envolvidos com a regulação da transcrição, incluindo sinal de localização nuclear, um domínio de dimerização e domínios de ligação ao DNA. Os domínios de ligação ao DNA são compostos de um domínio SAND (Sp100, Aire-1, NucP41/75, DEAF-1), dois homeodomínios *plant* - (PHD) tipo *zinc finger*. Recentemente foi visto que o domínio PHD-1 de Aire reconhece resíduos não-metilados de lisina na posição 4 de histonas H3. A não-metilação de lisinas nessa posição é indicativo de loci transcionalmente silenciados. Isto sugere que interação de Aire com esses resíduos poderia promover o recrutamento dessa molécula para regiões onde a cromatina esteja inativa. Nesses locais, Aire poderia exercer sua influência <sup>[119]</sup>.

Os mecanismos moleculares pelos quais o gene *Aire* regula a transcrição continuam pouco entendidos. Algumas evidências afirmam Aire, aparentemente, não atua como os fatores de transcrição convencionais, que se ligam a regiões promotoras e dirigem o início da

transcrição de um RNAm. Aire atua sob milhares de genes, incluindo loci com grandes distâncias cromossômicas e com cinéticas de atuação diferentes na periferia <sup>[119]</sup>.

Aparentemente, Aire atua como um complexo transcricional envolvendo múltiplas proteínas relacionadas com diversas funções no núcleo. Ele se associa a proteínas envolvidas nos processos de modificação da cromatina e iniciação da transcrição, como DNA-PK (DNA dependente de quinase), TOP2a (Topoisomerase 2a), RNAPII (RNA polimerase II), Ku80 e Ku70 <sup>[119]</sup>. Outra proteína encontrada no complexo transcricional controlado pelo Aire é a CBP (Proteína ligadora de CREB), esta proteína atua na cromatina promovendo modificações estruturais e preparando a arquitetura da cromatina para a ação do Aire <sup>[120]</sup>.

Aire atua também como um regulador transcricional na elongação do RNAm, interagindo com o P-TEFb (Fator B de transcrição e elongação positiva). Esse fator é uma ciclina dependente de quinase requerida no controle da ação da RNAPII (RNA polimerase II) desde o início da transcrição até a fase de elongação produtiva. Assim como outros fatores de transcrição, Aire recruta P-TEFb para a região promotora dos genes-alvo resultando no aumento da elongação e da eficiência da transcrição <sup>[120]</sup>. De forma semelhante, Aire está envolvido em complexos que regulam os eventos de processamento alternativo do pré-mRNA. Conhecidamente, os processos de elongação transcricional e de processamento do pré-mRNA são eventos que ocorrem simultaneamente em células eucarióticas <sup>[119]</sup>. Dentro do núcleo, Aire está localizado em estruturas relacionadas com a formação, modificação e armazenamento de pré-mRNA em processamento e também de alguns fatores de transcrição e denominadas de *speckles* nucleares <sup>[60]</sup>.

Visando o melhor entendimento acerca dos processos de tolerância imunológica, propomos nesta abordagem, avaliar a expressão de genes envolvidos na modulação das respostas imunes como *H2-Q7(Qa-2)*, *H2-T23(Qa-1)*, *H2-Q10(Qa10)*, assim como o gene *Aire* ao longo do desenvolvimento do órgão-chave na indução da tolerância central, o timo. Além disso, cientes da importância dos mecanismos de tolerância que agem em outros locais do corpo, como nos órgãos linfóides periféricos e em sítios imunologicamente privilegiados, propomos avaliar a expressão desses genes durante alguns períodos do desenvolvimento de órgãos, como intestino, fígado, baço, placenta e cérebro.

Conhecidamente, animais de diferentes linhagens como, BALB/c e C57BL/6, possuem padrões de resposta imune distintos para os mesmos patógenos,

conseqüentemente, acredita-se que os processos de regulação das respostas imunes nessas duas linhagens também sejam particulares. Adicionalmente, a expressão de moléculas não-clássicas do MHC varia de acordo com o tipo de tecido e de um indivíduo para o outro. Dessa forma, propomos, avaliar e comparar a expressão dos genes *H2-Q7(Qa-2)*, *H2-T23(Qa-1)*, *H2-Q10(Qa10)* e *Aire* entre animais BALB/c e C57BL/6 de diferentes idades.

Consideramos importante o estudo destes genes, uma vez que nos últimos anos tem sido observado aumento significativo do número de trabalhos que procuram reavaliar as bases moleculares da geração da tolerância central e periférica nos linfócitos T para a prevenção da autoimunidade.



# Hipóteses

## 2. HIPÓTESES

2.1. Genes que codificam moléculas não-clássicas do MHC relacionadas com indução de tolerância imunológica apresentam expressão diferencial no timo fetal durante os processos de educação tímica.

2.2. Animais das linhagens C57BL/6 e BALB/c, ao longo do seu desenvolvimento, apresentam perfis distintos de expressão de genes relacionados com a modulação do sistema imune no timo e nos órgãos linfóides periféricos.

2.3. Órgãos linfóides periféricos, assim como o timo, expressam o gene *Aire* ao longo do seu desenvolvimento.

# Objetivos

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterizar a expressão de genes não-clássicos do MHC de classe I com envolvimento na modulação das respostas imunes através da indução de tolerância imunológica, como *H2-Q7(Qa-2)*, *H2-T23(Qa-1)*, *H2-Q10(Qa10)* durante a ontogenia do timo e de órgãos linfáticos periféricos, correlacionando seus perfis de expressão gênica com a do gene *Aire*, reconhecidamente implicado no desenvolvimento de tolerância central.

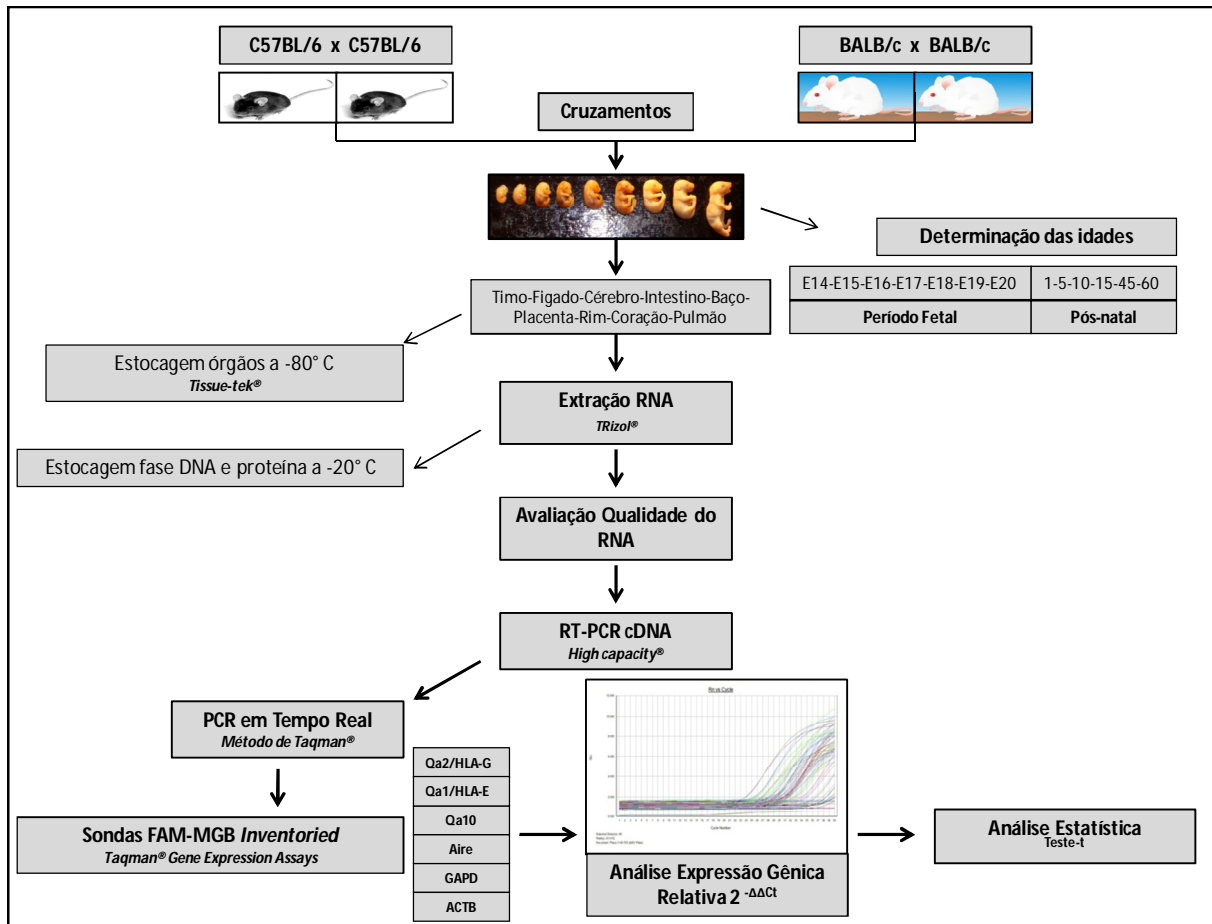
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- I - Caracterizar o perfil de expressão do gene *Aire*, durante a ontogenia do timo,
- II - Caracterizar os perfis de expressão dos genes *H2-Q7(Qa-2)*, *H2-T23(Qa-1)*, *H2-Q10(Qa10)* e *Aire* em órgãos linfóides periféricos, como baço, intestino e fígado, em paralelo com a ontogenia do timo,
- III - Caracterizar os perfis de expressão dos genes *H2-Q7(Qa-2)*, *H2-T23(Qa-1)*, *H2-Q10(Qa10)* e *Aire* em sítios imunoprivilegiados, como cérebro e placenta, em paralelo com a ontogenia do timo,
- IV - Avaliar e comparar os níveis de expressão dos genes *H2-Q7(Qa-2)*, *H2-T23(Qa-1)*, *H2-Q10(Qa10)* e *Aire* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos das linhagens C57BL/6 e BALB/c.

# Material e Métodos

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento experimental foi realizado de acordo com a **Figura 5**.



**Figura 5:** Fluxograma da estratégia experimental. Cada procedimento se encontra descrito em Material e Métodos.

##### 4.1. LINHAGENS ISOGÊNICAS DE CAMUNDONGOS

As matrizes das linhagens C57BL/6 e BALB/c (*Specific Pathogen Free*) foram adquiridas junto ao Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. As linhagens foram mantidas por cruzamentos isogênicos no Laboratório de Imunogenética Molecular – Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Para o acasalamento foram mantidos juntos, quatro fêmeas e dois machos por caixa. Os animais foram criados e isolados em câmara isoladora (Alesco®, São Paulo, Brasil) com dispositivos com poros de 0.45 mm para a filtragem do ar, em temperatura constante de 25° C, ciclo de

iluminação de 12 horas, com maravalha, água e ração *ad libitum*. As fêmeas prenhas foram sacrificadas através de deslocamento cervical, conforme as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo aprovado: N° 043/2009 – **ANEXO A**). Os fetos foram coletados através de incisão abdominal e imersos em solução salina 0,9% estéril em banho de gelo. Um dos fetos de cada ninhada foi fixado em formol 10% tamponado para posterior análise morfológica para determinação da idade, os outros, foram utilizados para remoção cirúrgica do timo e de outros órgãos sob estereomicroscópio para posterior extração de RNA total. Foram utilizadas pelo menos 2 fêmeas prenhas de cada linhagem para cada uma das idades (duplicata amostral), sendo que cada amostra foi composta de um *pool* de timos e/ou outros órgãos de uma mesma ninhada (duas ninhadas independentes). Para obtenção das amostras de animais com idades posteriores ao nascimento foi utilizado um número mínimo de 2 animais para cada idade.

#### 4.2. DETERMINAÇÃO DAS IDADES FETAIS

As idades pós-coito (embrionárias) dos fetos foram confirmadas através da observação das características morfológicas durante cada fase do desenvolvimento fetal. A análise morfológica dos fetos foi realizada durante a evolução da gestação, observando o desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores, como também avaliando o surgimento dos órgãos dos sentidos (olhos e orelhas) e o comprimento dos fetos (cabeça e cauda). De acordo com Rugh <sup>[157]</sup>, cada dia de gestação apresenta uma determinada característica que reflete a idade do feto, assim pôde-se determinar a idade fetal com precisão. Além disso, o aparecimento do *plug* vaginal na manhã seguinte ao coito foi indicativo do início da gestação e marcado como dia zero. Para os animais com idades posteriores ao nascimento, o dia do nascimento foi considerado o dia zero.

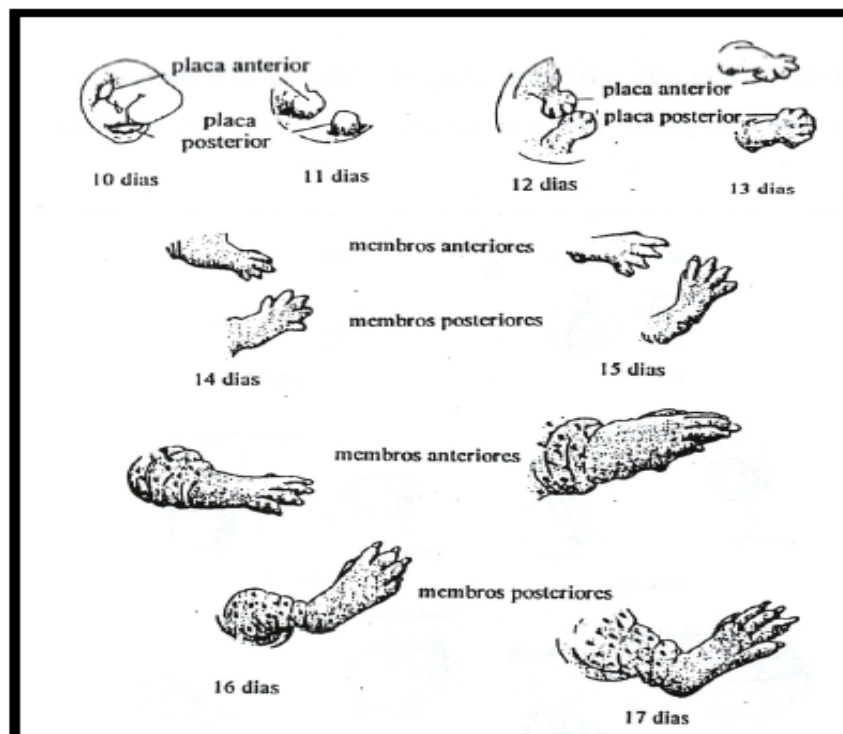
##### ► Características morfológicas de desenvolvimento dos fetos

###### → *Desenvolvimento dos membros*

As características dos membros anteriores e posteriores dos fetos de camundongos em cada dia gestacional foram determinadas segundo Rugh <sup>[122]</sup> e estão descritas na **Tabela 1** e mostradas nas **Figuras 6 e 7**.

**Tabela 1.** Descrição da morfologia dos fetos durante a evolução da gestação.

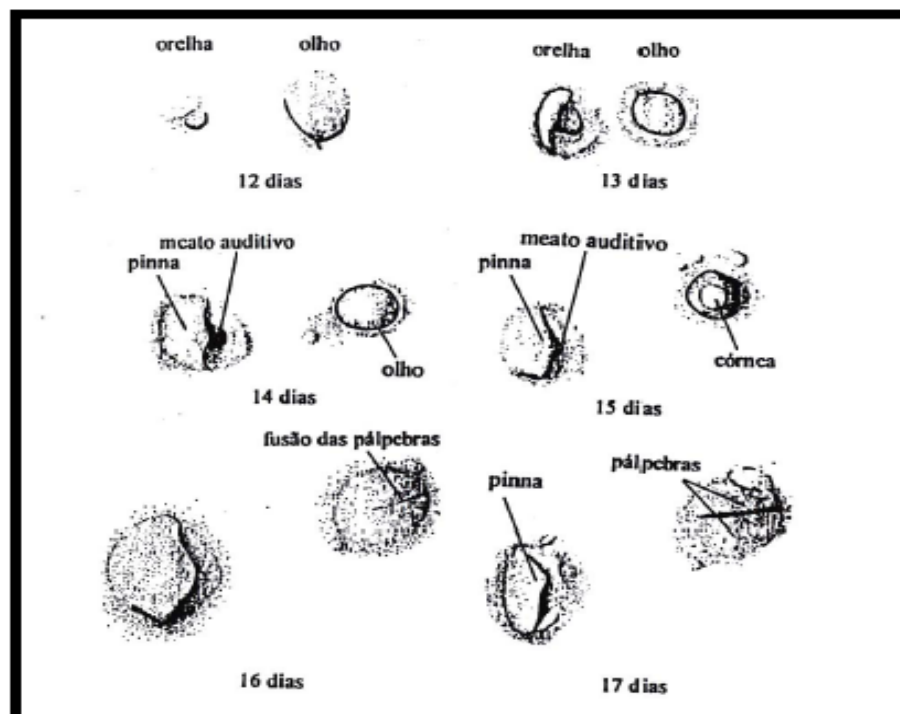
| Idade dos Fetos | Membros Anteriores  | Membros Posteriores                    |
|-----------------|---|--|
| E9.5            | Membros como uma pequena saliência  | Membros como uma pequena saliência     |
| E10.5           | Membros semicirculares  | Membros como uma pequena saliência     |
| E11.5           | Separação em patas e placas circulares  | Membros semicirculares                 |
| E12.5           | Placas de forma pentagonal  | Separação em patas e placas circulares |
| E13.5           | Placas recortadas   | Placas de forma pentagonal             |
| E14.5           | Dígitos separados distalmente, mas ainda próximos à palma.                                  | Placas profundamente recortadas        |
| E15.5           | Dígitos inteiramente separados e divergentes; extremidades das falanges começam a aparecer. |  |
| E16.5           | Dígitos 2 a 5 próximos e paralelos; extremidades das falanges definidas.                    |  |
| E17.5           | Dedos e pés completamente palmados como em recém-nascidos.                                  |  |

**Figura 6.** Desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores durante a gestação de camundongos (E 10.5 a E17.5) <sup>[122]</sup>.



→ *Desenvolvimento dos órgãos dos sentidos*

As vesículas ópticas largas são aparentes aos E9.5 dias de gestação e aos E12.5 dias os olhos são grandes e ovais. Durante os 3 dias subseqüentes algumas partes dos olho tornam-se visíveis através da córnea, que são temporariamente expostas, pois posteriormente são cobertas completamente pelas pálpebras que crescem até aos E16.5 dias de gestação. A pinna, lâmina dupla e fina de pele dobrada na região da orelha, começa a crescer em direção ao meato auditivo aos E13.5 dias e quase o cobre completamente aos E17.5 dias de gestação<sup>[122]</sup>. Essas características estão mostradas na **Figura 7**.



**Figura 7.** Desenvolvimento dos órgãos do sentido (modificações externas) durante a gestação de camundongos (E12.5 a E17.5)<sup>[122]</sup>.

#### 4.3. REMOÇÃO DOS ÓRGÃOS

Após o sacrifício das fêmeas prenhas, os animais foram rapidamente dissecados, fetos e recém-nascidos com até 3 dias de nascido foram dissecados com auxílio de lupa estereoscópica. Foi realizada uma incisão abrindo a região abdominal até a região torácica, e então o esterno foi cortado expondo o timo, identificado pelos dois lobos característicos.

Além disso, foram retirados o coração, o fígado, os pulmões, os rins, o intestino, o baço (idades posteriores ao nascimento), a placenta e o cérebro, os quais foram imediatamente processados para a extração de RNA total e/ou dispostas em *Tissue-tek*® (Sakura Finetek, USA), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a - 80° C.

#### 4.4. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Com a finalidade de prevenir a contaminação por ribonucleases no isolamento e manuseio dos RNAs, toda a vidraria, tubos plásticos, espátulas, pinças e “pulgas magnéticas” utilizadas foram previamente autoclavadas. Todos os procedimentos foram realizados com luvas de látex sem talco e descartáveis.

Para a extração do RNA total dos órgãos dos camundongos, foi utilizado o reagente TRizol® de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Foram adicionados 200 µL de solução salina 0,9 % estéril em um criotubo contendo 1 mL de TRizol®, sendo que o volume de tecido não pode ultrapassar 10 % do volume do TRizol®. O tecido foi imediatamente homogeneizado com auxílio de um micro homogeneizador tipo *potter* e posteriormente com um pipetador procurou-se dissociar os fragmentos do tecido, ainda restantes. Após esse procedimento, a amostra foi deixada em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente, promovendo a dissociação nucleoprotéica. Em seguida, a amostra foi transferida para um tubo Eppendorf (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha) de 1,5 mL e foi adicionado clorofórmio (0,2 mL/1 mL de Trizol - Merck®, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram agitadas em vórtex por aproximadamente 15 segundos e deixadas por três minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas por 15 minutos a 2-6° C (12000 x g). Após a centrifugação, cada amostra estava dividida em três fases.

Para extração do RNA, a fase aquosa foi transferida para outro tubo Eppendorf e o RNA precipitado com álcool isopropílico gelado (Mallinckrodt Baker®, Phillipsburg, NJ, USA). As preparações de RNA ficaram estocadas em isopropanol a -20° C. As fases contendo o DNA e proteínas foram estocadas a -20° C. Próximo à utilização do RNA, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 2-8° C (12000 x g) e o sobrenadante foi removido. O *pellet* de RNA formado foi lavado em etanol-DEPC (Dietil Pirocarbonato - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) 75% a frio. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2-8° C (7500 x g). A

lavagem foi repetida mais uma vez. Após secagem natural do *pellet*, o RNA foi ressuspenso em água Milli-Q-DEPC livre de RNase (Ribonuclease)/DNase (Desoxiribonuclease). As amostras de RNA foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

#### 4.5. QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro Gene Quant II (Pharmacia Biotech®, Cambridge, Reino Unido). A solução de RNA foi diluída 100x em água Milli-Q-DEPC e submetida a dosagens. As dosagens tiveram como base a seguinte estimativa: 1U de  $A_{260} = 40\ \mu\text{g RNA/mL}$ . Foram utilizadas preparações livres de proteína ( $A_{260}/A_{280} \cong 1,6$ ) e livres de fenol ( $A_{206}/A_{230} \cong 1,6$ ). A integridade das espécies de RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídeo.

#### 4.6. ELETROFORESE DE RNA TOTAL EM GEL DENATURANTE <sup>[123]</sup>

##### →Preparação do Gel

A agarose (70 mL) foi fundida em água Milli-Q autoclavada (1,5 % de agarose), e quando à temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ , foi adicionado 20 mL de formaldeído (37 %) e 22 mL de tampão de migração 5X concentrado (20,6 g de MOPS [ácido propano sulfônico 3-([N-morfolino)]], dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 7,0 ajustado com NaOH 2N e adicionados 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, volume final ajustado para 1000 mL). O gel foi solidificado em suporte de acrílico, que inicialmente foi tratado com NaOH 0,5 M por 10 minutos, assim como a cuba e o pente para eliminação de RNase sendo posteriormente lavado com água Milli-Q autoclavada.

##### →Preparação das amostras de RNA

Em um tubo *Eppendorf* novo e autoclavado disposto em banho de gelo foram adicionados 4,5  $\mu\text{L}$  de solução de RNA (2  $\mu\text{g}$  de RNA), 2  $\mu\text{L}$  de tampão de migração MOPS (5X); 3,5  $\mu\text{L}$  de formaldeído (37%) (Merck®, Alemanha) e 10  $\mu\text{L}$  de formamida. A mistura foi então incubada a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, sendo posteriormente resfriada imediatamente em banho de gelo. Adicionou-se 1  $\mu\text{L}$  de brometo de etídeo 1:10 (solução estoque 10 mg/mL) e

2  $\mu\text{L}$  de *dye loading solution* (1/10 do volume). As amostras foram então aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 80 V por cerca de 90 minutos. As bandas de RNAr 28 S (4,8 Kb), 18 S (1,9 Kb) e 5 S foram visualizadas em transluminador UV (Ultravioleta) e fotografadas com câmera digital.

#### 4.7. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA E SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR)

Antes da realização da reação em cadeia da polimerase em tempo – real (*Real Time* – PCR), as amostras que no gel mostravam algum indício de contaminação por DNA, foram tratadas com DNase (*Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* - Invitrogen®). Em uma alíquota de 1  $\mu\text{g}$  de RNA, foram adicionados 1  $\mu\text{L}$  de DNase (1 U/  $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de tampão e o volume foi completado para 10  $\mu\text{L}$  com água Milli-Q-DEPC. Essa solução foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente seguido da adição de 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 25 mM (Invitrogen®) e uma nova incubação por 15 minutos a 65° C. Em seguida, foi realizada uma PCR comum para confirmar a ausência de DNA pela ausência de produto após a reação. Os reagentes e as concentrações finais utilizadas estão listados na **Tabela 2**.

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa da Applied Biosystems® (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* - Applied Biosystems®, Foster City, CA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação, os cDNAs foram preparados a partir de 500  $\text{ng}$  de uma solução de RNA. Foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  de solução de RNA das amostras dos órgãos (timo, fígado, cérebro, intestino, baço e placenta) em diferentes idades. Assim, para cada reação com 2  $\mu\text{L}$  de solução de RNA, utilizou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de RT *buffer*, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP, 2,5  $\mu\text{L}$  de RT (*random primers*), 1,25  $\mu\text{L}$  de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 0,63  $\mu\text{L}$  de *RNAse OUT Inhibitor* e 15,12  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q-DEPC, **Tabela 3**.

A quantidade citada de cada reagente foi multiplicada pelo número de amostras de RNA para a confecção de um “mix”. Em seguida, 23  $\mu\text{L}$  desse mix foram adicionados a cada tubo *Eppendorf*. Em seguida foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de RNA de cada amostra nos tubos devidamente identificados. Finalmente os tubos *Eppendorf* foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os ciclos de PCR. As condições da reação de transcrição estão listadas na **Tabela 4**. O volume final da reação foi estimado em 25  $\mu\text{L}$  e posteriormente foi

preparada uma solução uso cDNA (75 ng / $\mu$ L) em um volume de 125  $\mu$ L. As amostras de cDNA foram estocadas a -20° C até a sua utilização.

**Tabela 2.** Reagentes e concentrações utilizadas para o tratamento com DNase.

| Reagente                      | Concentração       |
|-------------------------------|--------------------|
| H <sub>2</sub> O Milli-Q-DEPC |                    |
| DNase                         | 1 U/ $\mu$ L       |
| Buffer                        | 1X                 |
| EDTA <sup>a</sup>             | (25 mM)            |
| RNA                           | 1 $\mu$ g/ $\mu$ L |
| Volume final                  | 10 $\mu$ L         |

<sup>a</sup> Ácido etilenodiamino tetra-acético

**Tabela 3.** Reagentes e concentrações utilizadas para a reação de transcrição reversa de cDNA.

| Reagente  | Concentração    |
|---|-----------------|
| H <sub>2</sub> O Milli-Q-DEPC                   |                 |
| RT Buffer                                       | 10X             |
| RT Random Primers                               | 10X             |
| dNTP Mix  | 25X (100 mM)    |
| MultiScribe <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase | 50 U/ $\mu$ L   |
| RNase Inhibitor                                 | 110 U/ $\mu$ L  |
| RNA   | 500 ng/ $\mu$ L |
| Volume final                                    | 25 $\mu$ L      |

**Tabela 4.** Condições da reação de transcrição para cDNA<sup>a</sup>.

| Temperatura | Tempo | Ciclos |
|-------------|-------|--------|
| 25° C       | 10´   | 1X     |
| 37° C       | 120´  | 1X     |
| 85° C       | 5´´   | 1X     |
| 4° C        | ∞     |        |

<sup>a</sup> Condições otimizadas para o uso do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*

#### 4.8. REALIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL (*Real Time* – PCR)

A quantificação da expressão gênica foi realizada, utilizando RT-PCR, em aparelho *7500 Real-Time PCR System*<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>) disponível no Laboratório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP). As reações foram preparadas utilizando-se o *Taqman*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems<sup>®</sup>) otimizado para reações com o conjunto de sondas e *primers* pré-formulados do *Taqman*<sup>®</sup> *Gene Expression Assays* e *Taqman*<sup>®</sup> *Endogenous Controls* (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

Em relação aos genes utilizados como controles endógenos nas análises de quantificação relativa, utilizamos os conjuntos de sondas/*primers* específicos para o *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase*) e *ACTB* ( $\beta$ -*Actina*) solicitados em formato de *Taqman*<sup>®</sup> *Endogenous Controls*. Para a verificação da estabilidade de expressão dos controles endógenos nas diferentes amostras, realizamos o cálculo da razão das médias de Cts (*Threshold cycle*) desses genes de acordo com as diferentes idades, órgãos e linhagens,

#### APÊNDICE A.

Os conjuntos de *primers*/sondas específicos para os genes-alvo *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* foram solicitados ao fabricante como *Inventoried Assays*. Informações adicionais acerca dos conjuntos de *primers*/sondas utilizados encontram-se no **ANEXO B**.

O preparo e armazenamento do material foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, excetuando-se o volume final de cada reação otimizado em 10  $\mu$ L. Os ensaios de expressão foram realizados em *singleplex*. Para cada reação foram utilizados 2  $\mu$ L de água Milli-Q-DEPC, 5  $\mu$ L de *TaqMan*<sup>®</sup> *PCR Universal Master Mix* (Applied Biosystems<sup>®</sup>), 0,5  $\mu$ L de sonda *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Assays* e 2,5  $\mu$ L de cDNA. As concentrações de cada um dos reagentes se encontram na **Tabela 5**. Todas as etapas do procedimento descrito foram realizadas com as amostras imersas em gelo e com pouca exposição à luz.

Na preparação das reações foram utilizadas placas de polipropileno para 96 reações *MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate* (Applied Biosystems<sup>®</sup>) cobertas com adesivos para placas ópticas resistentes a álcool e altas temperaturas *MicroAmp - optical adhesive film* (Applied Biosystems<sup>®</sup>). A reação da PCR em tempo-real foi realizada de acordo com as condições de ciclagem universal fornecida pelo ABI PRISM<sup>®</sup> *7500 Sequence Detection System*

(SDS V.3) do aparelho *7500 Real-Time PCR System*<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>) e estão descritas na **Tabela 6**.

**Tabela 5.** Reagentes e concentrações utilizadas para a reação de PCR em tempo-real.

| Reagente                                     | Concentração |
|--|--------------|
| H <sub>2</sub> O Milli-Q-DEPC                |              |
| TaqMan <sup>®</sup> PCR Universal Master Mix | 2X           |
| TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays   | 20X          |
| cDNA   | 75 ng/ μL    |
| Volume final                                 | 10 μL        |

**Tabela 6.** Condições de ciclagem universal para amplificação no aparelho *7500 Real-Time PCR System*<sup>®</sup>

| Temperatura | Tempo | Ciclos |
|-------------|-------|--------|
| 50 °C       | 2'    | 1X     |
| 95 °C       | 10'   |        |
| 95°C        | 15''  |        |
| 60°C        | 1'    | 40X    |
| 72°C        | 25''  |        |

Apesar dos conjuntos de primers/sondas do *Inventoried Assays, Taqman<sup>®</sup> Gene Expression Assays*, garantirem 100% de eficiência de amplificação, permitindo a aplicação do método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [124], nesse estudo foi realizado o cálculo da eficiência das reações através da montagem de uma curva padrão para cada um dos *primers*, utilizando-se diluições seriadas (1/2 a 1/16) das amostras de cDNA de timo de animais com E16.5 dias. Os valores de eficiência da reação (E) foram calculados para cada gene individualmente a partir do valor obtido de *slope* utilizando-se a fórmula:  $E=10^{-1/slope}$ . Os valores de *Slope*,  $R^2$  e a eficiência da reação corrigida para porcentagem estão descritas na **Tabela 7**.

| Genes         | Slope  | R <sup>2</sup> | Eficiência (%) |
|---------------|--------|----------------|----------------|
| <b>ACTB</b>   | -3.236 | 0.998          | 99             |
| <b>GAPDH</b>  | -3.367 | 0.986          | 99             |
| <b>H2-Q7</b>  | -3.481 | 0.972          | 98             |
| <b>H2-Q10</b> | -3.324 | 0.997          | 99             |
| <b>H2-T23</b> | -3.382 | 0.963          | 96             |
| <b>Aire</b>   | -3.332 | 0.992          | 99             |

**Tabela 7.** Eficiência e valores de *Slope* e R<sup>2</sup> dos *primers* utilizados para PCR real-time.

Os valores de *Slope* e R<sup>2</sup> foram fornecidos pelo *7500 Software v2.0*. A eficiência E foi calculada pela fórmula  $E = 10^{(-1/slope)}$ . O gráfico gerado pela concentração de cDNA e os respectivos valores de CT foram empregados para o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis dado pelo R<sup>2</sup>. (User Bulletin#2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

Para a quantificação relativa dos transcritos, cada amostra foi avaliada em triplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cuja diferença de amplificação, valores de Cts, não excedeu meio-ciclo [125]. As triplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que meio-ciclo, mesmo após repetição do experimento, foram desconsideradas. Em todas as placas foram realizados controles negativos das reações para todos os genes estudados (*H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23*, *Aire*, *GAPDH* e *ACTB*), sendo que nessas reações adicionou-se 4 µL de água Milli-Q-DEPC. Assim, as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas. Ainda, foram desconsideradas amostras que não amplificaram ou amplificaram com Ct ≥ 37. O valor de *threshold* e a linha de base (*Baseline*) foram determinados automaticamente pelo software (*SDS V.3*) do aparelho *7500 Real-Time PCR System*®.

Em nosso estudo, a normalização e a quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [125]. A média dos valores da expressão dos genes endógenos (*ACTB* e *GAPDH*) foi utilizada para obtenção do valor do  $\Delta Ct$  [ $\Delta Ct = Ct$  (Gene-alvo) – Ct (Endógenos)] em cada amostra. Os resultados ( $\Delta Ct$ ) foram utilizados para o cálculo das diferenças dos valores de expressão entre as amostras e o calibrador obtendo-se os valores de  $\Delta\Delta Ct$ . Assim, foi aplicada a seguinte fórmula:

**QR (Quantificação Relativa) =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct$  da amostra-alvo -  $\Delta Ct$  do calibrador].**

Foi utilizado como calibrador o menor dos valores de  $\Delta Ct$  obtidos. Com essa abordagem, foi possível comparar em uma mesma escala (0 a 1) as diferenças entre os perfis de expressão gênica. As amostras foram normalizadas juntas, de acordo com o interesse na análise de comparação da expressão gênica, ou seja, comparação entre os níveis de



expressão gênica, entre diferentes idades, entre os diferentes órgãos e entre as diferentes linhagens.

Usando o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , os dados são representados como a diferença (em vezes) na expressão gênica, que foi normalizada para dois genes endógenos de referência, sendo relativa ao calibrador (ou controle). Para o calibrador, o valor de  $\Delta\Delta Ct$  é igual a zero e  $2^0$  é igual a 1. Assim, mudanças na expressão gênica relativa ao calibrador são iguais a 1.

#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores são expressos como média + erro padrão da média. O teste estatístico *One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test* foi empregado para a análise dos perfis de expressão nos diferentes órgãos. Para comparação das diferenças de expressão em uma mesma idade entre linhagens, foi empregado o *Teste-t*. O teste estatístico *Two-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test* foi utilizado em análises envolvendo maior número de órgãos, idades e genes. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes.

# Resultados

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO DESENVOLVIMENTO FETAL

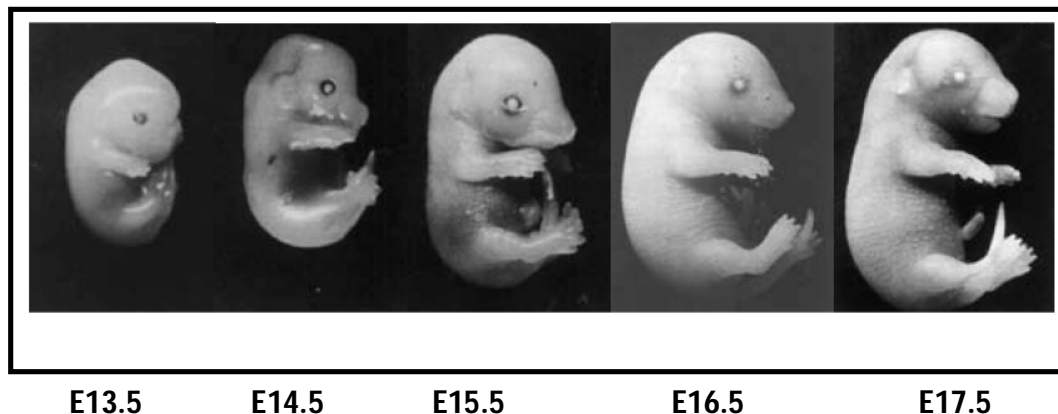
A utilização das chaves de características morfológicas de desenvolvimento mostradas na **Tabela 1** e **Figuras 6** e **7**, possibilitaram a determinação com segurança das idades fetais até o E17.5 dia de gestação. Para as idades posteriores seria necessário utilizar a análise de mudanças internas, como por exemplo, os centros de ossificações. Alguns fetos, mais tardios são difíceis de precisar a idade, por possuírem características comuns a mais de uma idade. Entretanto, neste estudo, a maioria das determinações etárias foi possível, já que a realização da inspeção visual para acompanhar o aparecimento do “*plug*” vaginal na manhã seguinte ao coito foi um método seguro para a demarcação do dia zero da gestação.

Em fetos com 13 dias (10 mm de comprimento) já é possível observar membros anteriores formados por uma placa recortada e os membros posteriores formados por placas em formato pentagonal, pode-se observar ainda, o aparecimento de um rudimento de orelha e a delimitação do olho. A evolução das características morfológicas durante a gestação de um camundongo é mostrada na **Figura 8**.

Em fetos com 14 dias de gestação (E14.5), observam-se os membros anteriores formados por dígitos separados, mas ainda próximos à palma, e os membros posteriores formados por placas bem mais recortadas; também nota-se o meato auditivo e o aparecimento da pinna (uma lâmina de pele dobrada que cresce no sentido do meato auditivo). Esses animais possuem cerca de 12 mm de comprimento.

Com 15 dias de gestação (E15.5), os fetos apresentam 15 mm e pode-se observar uma separação mais pronunciada dos dígitos e o aparecimento da córnea. Em fetos com E16.5 dias (16 a 17 mm), observa-se a definição das extremidades das falanges, assim como a definição da orelha e a fusão das pálpebras.

Já em fetos com E17.5 dias (17 a 18 mm), os pés e dedos apresentam-se como em recém-nascidos e a pinna cobre completamente o meato auditivo. Alguns fetos apresentam certa dificuldade de se precisar a idade, pois possuem características comuns a mais de uma idade.

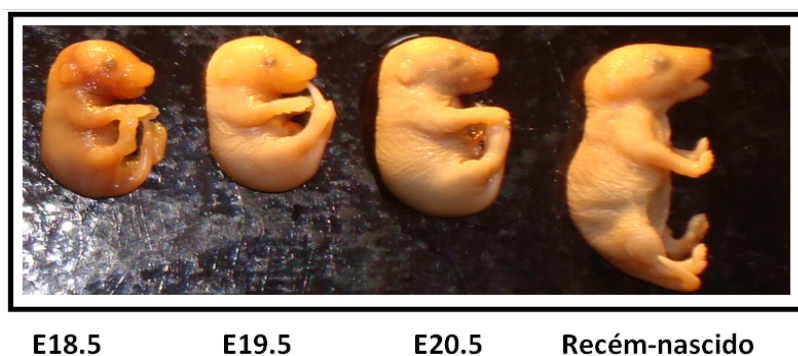


**Figura 8.** Características morfológicas de fetos ao longo da gestação com idades de E13.5 a E17.5 <sup>[150]</sup>.

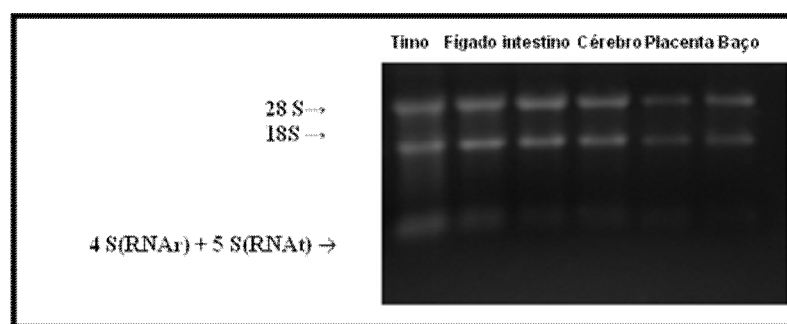
Fetos com E18.5, E19.5 e E20.5 dias possuem características semelhantes às observadas em fetos com 17 dias. Porém, de forma geral, o comprimento desses animais acompanha o seu desenvolvimento. Em fetos com E18.5 dias, o comprimento observado foi de 18 a 19 mm, já para os com E19.5 dias, observou-se 19 a 20 mm de comprimento. Fetos com E20.5, são bastante semelhantes aos recém-nascidos e o comprimento observado foi de 20 a 21 mm, **Figura 9**. Adicionalmente a observação do comprimento dos fetos no momento do sacrifício e a confirmação do dia zero pelo aparecimento do “*plug*” vaginal, nos permitiu determinar com precisão a idade de cada um dos fetos dos quais foram extraídos o RNA e DNA.

## 5.2. ANÁLISE DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL

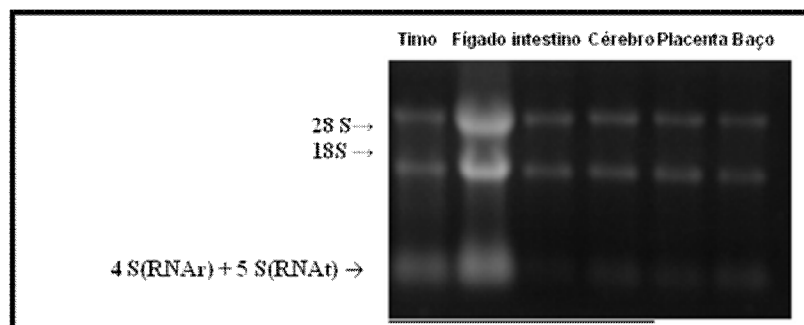
A análise da integridade das amostras de RNA total, obtidas a partir dos órgãos de fetos, recém-nascidos e adultos jovens de animais C57BL/6 e BALB/c, foi realizada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5%. Nas **Figuras 10 e 11**, pode-se observar as subunidades 28 S e 18 S de RNAr, mostrando a integridade e a qualidade da preparação, e também observa-se o pool de RNAt (4S) junto com RNAr 5 S.



**Figura 9.** Características morfológicas de fetos com idades de E18.5 a recém-nascido.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % mostrando o fracionamento das amostras de RNA total de alguns órgãos de fetos de camundongos C57BL/6.



**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % mostrando o fracionamento das amostras de RNA total de alguns órgãos de camundongos BALB/c.

### 5.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Neste estudo, foi realizada a quantificação da expressão relativa de genes envolvidos na modulação das respostas imunes através da indução de tolerância imunológica. Verificamos a expressão do RNAm de *Aire* e de genes não-clássicos do MHC de

classe I, como *H2-Q7(Qa2)*, *H2-Q10(Qa10)* e *H2-T23(Qa1)* ao longo do desenvolvimento de órgãos envolvidos em processos de tolerância imunológica como o timo, intestino, baço e fígado de animais da linhagem C57BL/6 e BALB/c. Ainda, a expressão desses genes foi avaliada em tecidos imunologicamente privilegiados como cérebro e placenta.

Os valores estatísticos de médias, medianas, erros e desvios padrões encontram-se descritos na **Tabela 8** no **APÊNDICE D**.

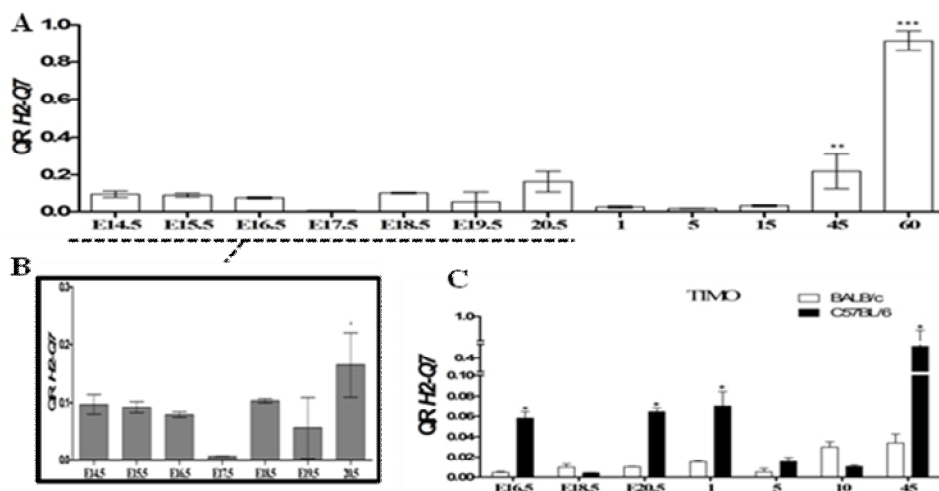
### 5.3.1 PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DO TIMO

O gene *H2-Q7*, ao longo do desenvolvimento do timo, se mostrou significativamente mais expresso em animais adultos jovens com 45 ( $P<0,05$ ) e 60 dias de idade ( $P<0,001$ ), sendo que em timo de animais com 60 dias os níveis desse transcrito foram 8 vezes mais elevados que o observado no período fetal, indicando que ocorre aumento gradativo nos níveis desse mRNA de acordo com o avanço da idade desses animais, **Figura 12 A**.

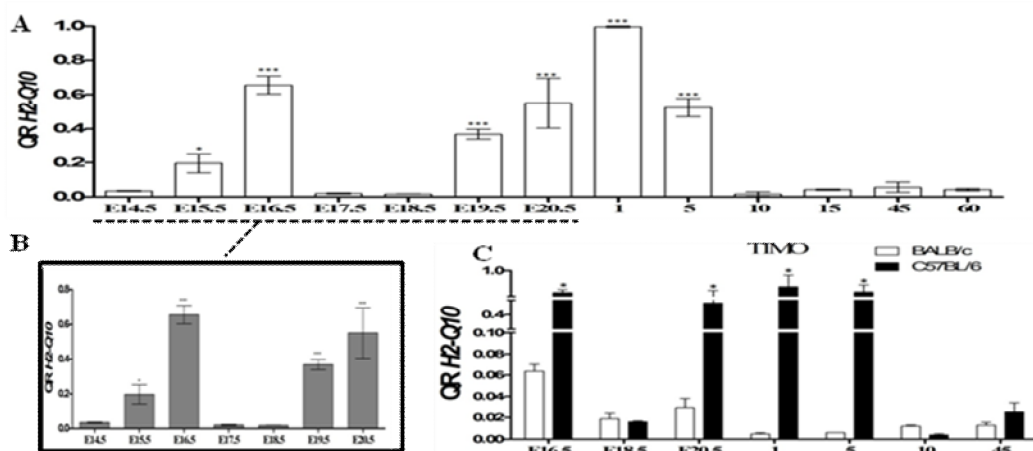
Durante o período fetal, foi observado aumento significativo ( $P<0,05$ ) nos níveis do mRNA de *H2-Q7* em timo de animais com E20.5 dias quando comparado às outras idades, **Figura 12 B**. De forma geral, tanto no período fetal quanto pós-natal, animais da linhagem C57BL/6 expressaram níveis significativamente mais elevados de transcritos para *H2-Q7* em comparação a animais da linhagem BALB/c de idades equivalentes. Foram observados níveis significativamente mais elevados de *H2-Q7* em timo de animais C57BL/6 com E16.5 ( $P=0,0142$ ), E20.5 ( $P=0,0063$ ), 1 ( $P=0,0037$ ) e 45 dias de idade ( $P<0,0001$ ), **Figura 12 C**.

Em relação ao perfil de expressão do *H2-Q10* em timos de animais C57BL/6, foi observado aumentos significantes dos níveis desse transcrito durante o período fetal, E15.5 ( $P<0,05$ ), E16.5, E17.5, E19.5, E20.5 ( $P<0,0001$ ), e peri-natal 1 e 5 dias ( $P<0,0001$ ) quando comparado entre as outras idades, **Figura 13 A e B**.

De forma semelhante à observada para o gene *H2-Q7*, os níveis de expressão de *H2-Q10* no timo foram significativamente mais elevados em animais da linhagem C57BL/6, com idades de E16.5, E20.5 ( $P<0,01$ ), 1 e 5 dias ( $P<0,001$ ), quando comparados a animais da linhagem BALB/c durante o período fetal e peri-natal, **Figura 13 C**.



**Figura 12.** Perfil de expressão do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento do timo. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento do timo de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento fetal do timo de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q7* durante o desenvolvimento do timo de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

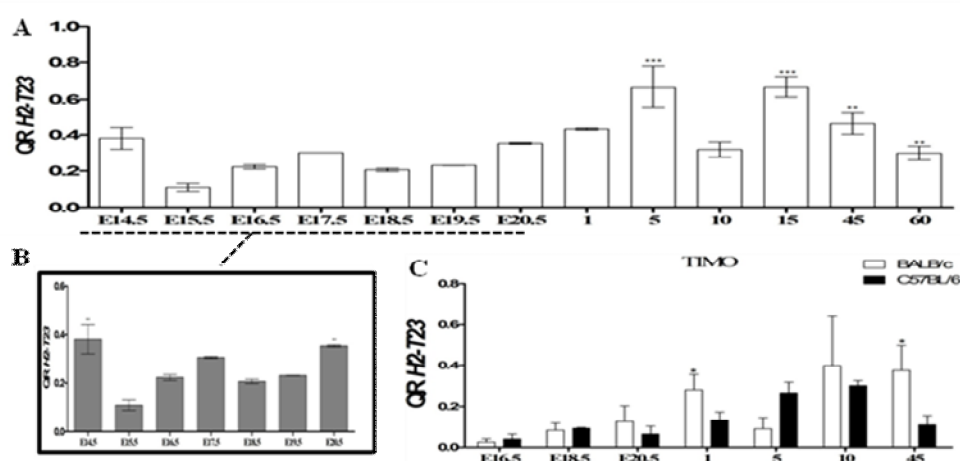


**Figura 13.** Perfil de expressão do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento do timo. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento do timo de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento fetal do timo de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q10* durante o desenvolvimento do timo de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

O perfil de expressão do gene *H2-T23*, visualmente, mostrou poucas variações ao longo do desenvolvimento do timo. Foram observadas aumentos significantes em timo de animais C57BL/6 com 5 e 15 dias ( $P < 0,001$ ) quando comparadas com outras idades. De

forma semelhante, em timo de animais com 45 e 60 dias foram observadas diferenças significantes ( $P < 0,05$ ) em comparação com as outras idades. Entretanto, quando analisamos somente o período fetal, foram observados níveis significativamente mais elevados ( $P < 0,05$ ) de mRNA de *H2-T23* por volta do dia E14.5 e E20.5 dia de desenvolvimento, **Figura 14 A e B**.

Diferentemente ao observado para o *H2-Q7* e *H2-Q10*, os níveis de *H2-T23* foram, de forma geral, significativamente mais elevados em timo de animais BALB/c com 1 e 45 dias, ( $P = 0,01$  e  $P = 0,0058$ , respectivamente). Para as idades restantes, apesar de não significativa, os níveis desse transcrito foram discretamente mais elevados em animais BALB/c em comparação a animais C57BL/6 de idades equivalentes, **Figura 14 C**.



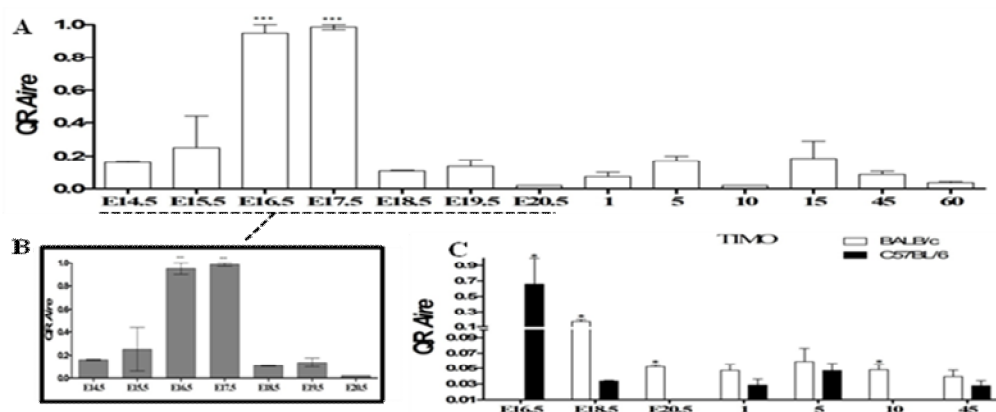
**Figura 14.** Perfil de expressão do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento do timo. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-T23* durante todo o desenvolvimento do timo de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento fetal do timo de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-T23* durante o desenvolvimento do timo de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

Em relação ao gene *Aire*, observou-se aumento significativo ( $P < 0,001$ ) nos níveis desse transcrito por volta do E16.5 e E17.5 dia de desenvolvimento fetal tímico de animais C57BL/6. Os maiores níveis de expressão de *Aire* ocorreram durante o período fetal do desenvolvimento tímico, entretanto, apesar de não significativa, é possível observar traços de expressão de *Aire* em períodos pós-natais e em timos de animais adultos, **Figura 15 A e B**.

Foi observado que, durante o desenvolvimento tímico, o pico de expressão de *Aire* em animais C57BL/6, ocorre por volta do E16.5 dia ( $P < 0,001$ ) e em animais BALB/c, por volta do E18.5 dia do desenvolvimento ( $P = 0,0001$ ). De maneira geral, com exceção do E16.5 dia,



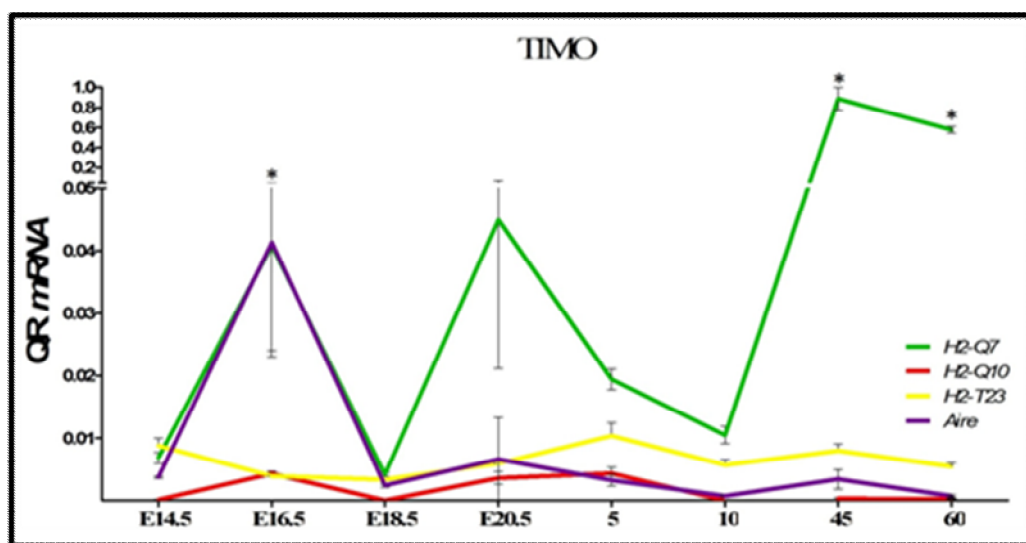
animais da linhagem BALB/c expressaram níveis mais elevados de *Aire* no timo em todas as outras idades analisadas, com aumentos significantes em timos de animais com E18.5 ( $P=0,0001$ ), E20.5 ( $P=0,0318$ ) e 10 dias ( $P=0.0004$ ), **Figura 15 C**.



**Figura 15.** Perfil de expressão do gene *Aire* durante o desenvolvimento do timo. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *Aire* durante o desenvolvimento do timo de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *Aire* durante o desenvolvimento fetal do timo de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *Aire* durante o desenvolvimento do timo de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p<0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P<0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

Quando analisamos juntos os perfis de expressão dos quatro genes, *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* ao longo do desenvolvimento tímico de animais C57BL/6, pôde-se observar que durante o período fetal, os genes *H2-Q7* e *Aire* foram significativamente mais expressos por volta do E16.5 dia ( $P<0,001$ ), sendo que os seus níveis foram 5 vezes mais elevados que os outros genes analisados no mesmo período. Em todas as idades avaliadas, fetais ou pós-natais, o gene *H2-Q7* foi grandemente o mais expresso nesse órgão, sendo cerca de 5 vezes mais expresso por volta do E20.5 dia e 100 vezes mais expresso que os outros genes em animais adultos com 45 e 60 dias de idade ( $P<0,001$ ), **Figura 16**.

Em relação aos genes restantes, *H2-Q10* e *H2-T23*, seus níveis de expressão se mantiveram abaixo de 0.02, sendo os níveis desse último, discretamente mais elevados do que os observados para o *Aire* e *H2-Q10*, em idades posteriores ao E18.5 dia de desenvolvimento, **Figura 16**.



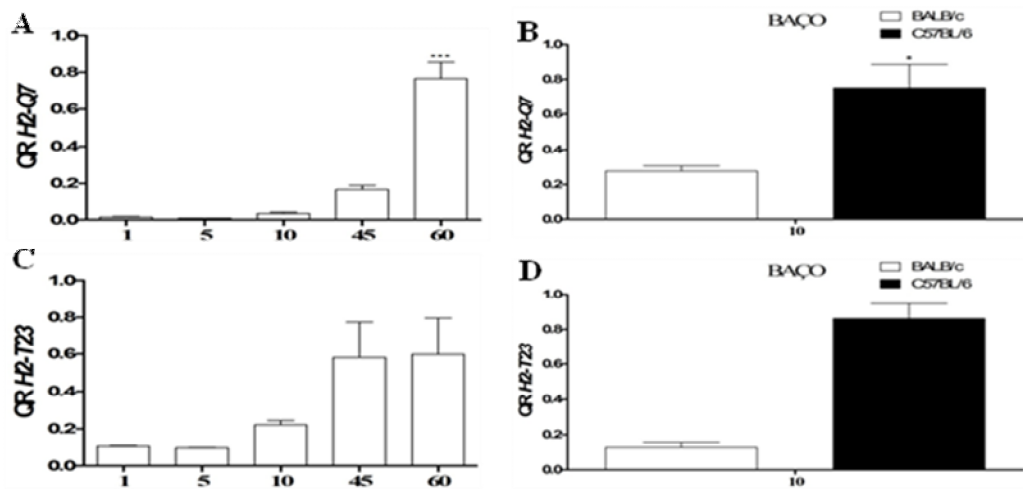
**Figura 16.** Perfis de expressão dos genes H2-Q7, H2-Q10, H2-T23 e Aire durante o desenvolvimento do timo em animais C57BL/6. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) estão representadas com (\*).

### 5.3.2. PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA NO BAÇO

Além da análise dos perfis de expressão gênica de *H2-Q7*(Qa2), *H2-Q10*(Qa10), *H2-T23*(Qa1) e *Aire* no contexto de um órgão linfóide central, como o timo, achamos conveniente avaliarmos a expressão desses genes em órgãos linfóides periféricos, como o baço. A extração de RNA a partir de amostras de baço fetal foi inviável, já que a observação e retirada desse órgão em animais com idades inferiores a 1 dia de nascido é bastante dificultosa devido as dimensões reduzidas desse órgão.

A expressão relativa de *H2-Q7* se mostrou significativamente aumentada e cerca de 8 vezes mais expresso, em baços de animais adultos com 60 dias de idade ( $P < 0,001$ ), em comparação ao período perinatal, **Figura 17 A**. Apesar de não ser significativo, é observado o aumento gradativo nos níveis dos transcritos de *H2-Q7* com o ganho da idade pelo animal, o mesmo padrão que foi observado no timo.

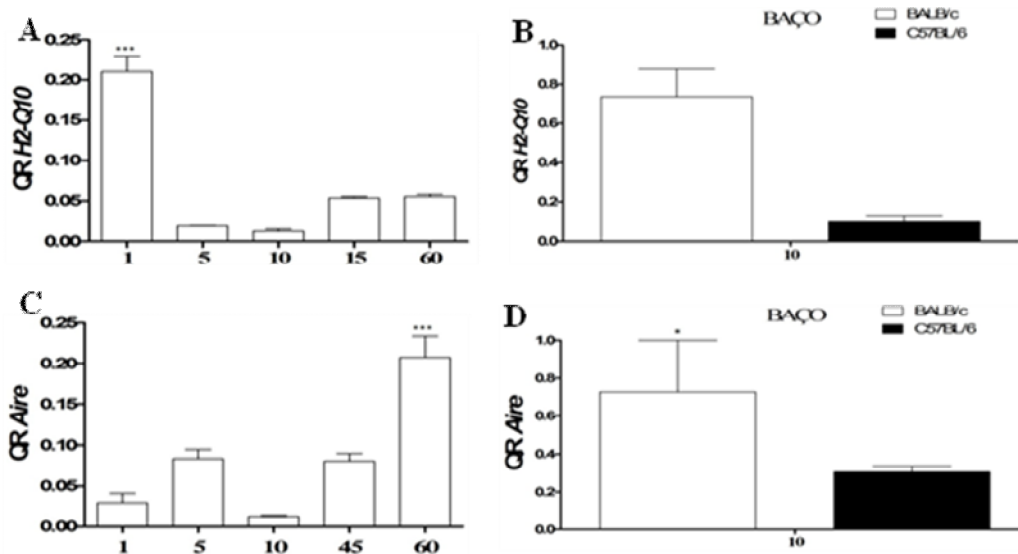
Assim como no timo, os níveis de *H2-Q7* no baço de animais com 10 dias, foram significativamente mais elevados ( $p = 0,0146$ ) na linhagem C57BL/6 em comparação a animais BALB/c de mesma idade. A média de expressão nessa idade foi cerca de 4 vezes maior em animais C57BL/6, **Figura 17 B**.



**Figura 17.** Perfil de expressão gênica durante o desenvolvimento pós-natal do baço. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento pós-natal do baço de animais C57BL/6. **B.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q7* durante o desenvolvimento do baço de animais C57BL/6 e BALB/c. **C.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento pós-natal do baço de animais C57BL/6. **D.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-T23* durante o desenvolvimento do baço de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

Em relação aos transcritos de *H2-T23*, não foram observadas diferenças significantes no perfil de expressão durante o desenvolvimento do baço em animais C57BL/6. Apesar disso, pode-se observar o aumento gradativo nos níveis de *H2-T23* com o aumento da idade, **Figura 17 C**. Quando foram comparados os níveis de expressão entre as duas linhagens, de maneira semelhante, não se observaram diferenças significantes, apesar de os níveis desse transcrito terem sido 4 vezes mais elevados em animais C57BL/6, **Figura 17 D**.

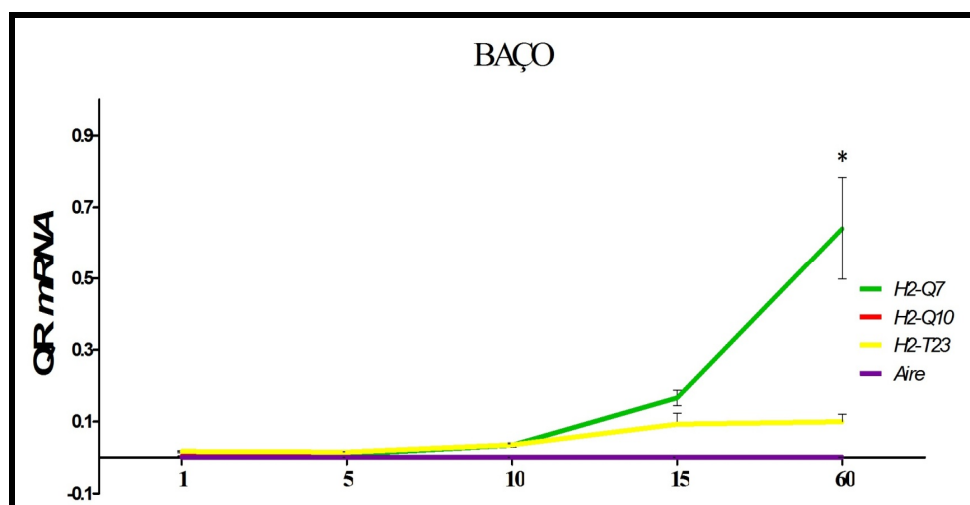
Os transcritos para o gene *H2-Q10*, no baço de animais C57BL/6, foram significativamente mais elevados em recém-nascidos com 1 dia de idade ( $P < 0,001$ ), todavia, os níveis desse transcrito ao longo do desenvolvimento se mantiveram diminuídos e abaixo de 0,07, **Figura 18 A**. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de *H2-Q10* entre animais das linhagem C57BL/6 e BALB/c, **Figura 18 B**.



**Figura 18.** Perfil de expressão gênica durante o desenvolvimento pós-natal do baço. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento pós-natal do baço de animais C57BL/6. **B.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q10* durante o desenvolvimento do baço de animais C57BL/6 e BALB/c. **C.** Quantificação relativa de RNAm do gene *Aire* durante o desenvolvimento pós-natal do baço de animais C57BL/6. **D.** Comparação dos perfis de expressão de *Aire* durante o desenvolvimento do baço de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos exposto em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

Em relação ao gene *Aire*, foram observados níveis significativamente mais elevados desse transcrito em baços de animais adultos com 60 dias ( $P < 0,001$ ). Esses níveis foram cerca de 3 a 5 vezes mais elevados, em comparação as outras idades analisadas, **Figura 18 C**. De forma semelhante ao observado no timo, os níveis de transcritos para o gene *Aire* no baço de animais BALB/c foram significativamente mais elevados ( $P = 0,0242$ ) do que em animais C57BL/6 de mesma idade, **Figura 18 D**.

Dos quatro genes analisados durante o desenvolvimento pós-natal do baço, foi observado que a partir dos 10 dias de idade, ocorre um aumento gradativo nos níveis do transcrito de *H2-Q7* e *H2-T23*, sendo que o gene *H2-Q7* foi significativamente o mais expresso em baços de animais com 60 dias de idade ( $P < 0,001$ ). Transcritos para o gene *Aire* e *H2-Q10* se mostraram diminuídos em todas as idades analisadas, **Figura 19**.



**Figura 19.** Perfis de expressão dos genes *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* durante o desenvolvimento pós-natal do baço em animais C57BL/6. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) estão representadas com (\*).

### 5.3.3. PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA NO FÍGADO

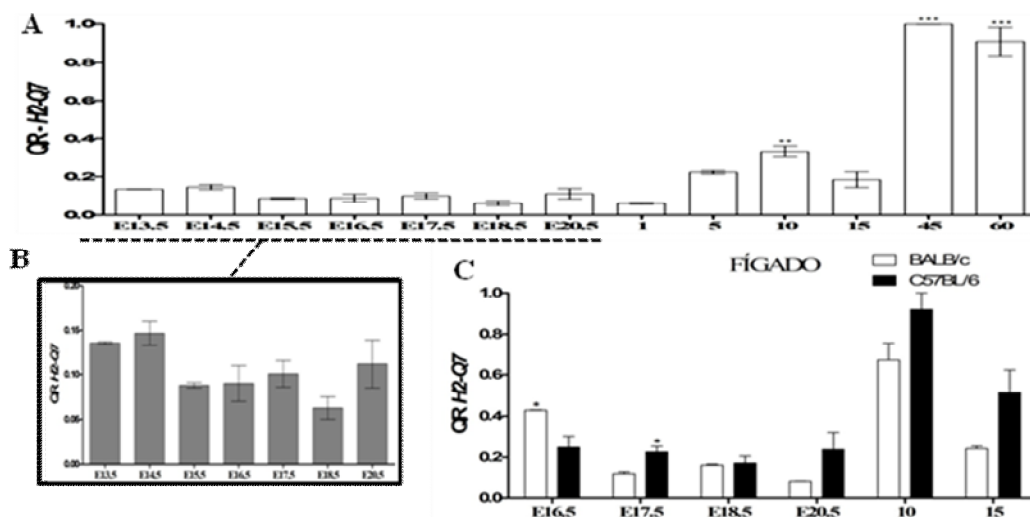
Nos últimos anos, estudos têm apontado o fígado como um órgão linfóide secundário por possuir múltiplas populações de células imunocompetentes, por desempenhar funções imunológicas e por ter grande importância durante os processos de hematopoese fetal.

Além disso, a exposição constante do fígado a antígenos e produtos de microorganismos presentes na dieta e a manutenção da vigilância contra microorganismos patogênicos, toxinas e células metastáticas, requerem complexos mecanismos que garantam a manutenção da tolerância imunológica nesse órgão<sup>[143]</sup>.

Embasados nisso, nós avaliamos a expressão dos genes *H2-Q7*(Qa2), *H2-Q10*(Qa10), *H2-T23*(Qa1) e *Aire* durante o desenvolvimento fetal e pós-natal do fígado de animais das linhagens C57BL/6 e BALB/c.

Os níveis de expressão do mRNA do *H2-Q7* foram significativamente ( $p < 0,001$ ) mais elevados no fígado de animais C57BL/6 com 10, 45 e 60 dias quando comparados com os níveis observados nas outras idades avaliadas. O maior nível de expressão de *H2-Q7* foi detectado em fígados de animais com 45 dias, cuja média de expressão foi cerca de 4 vezes

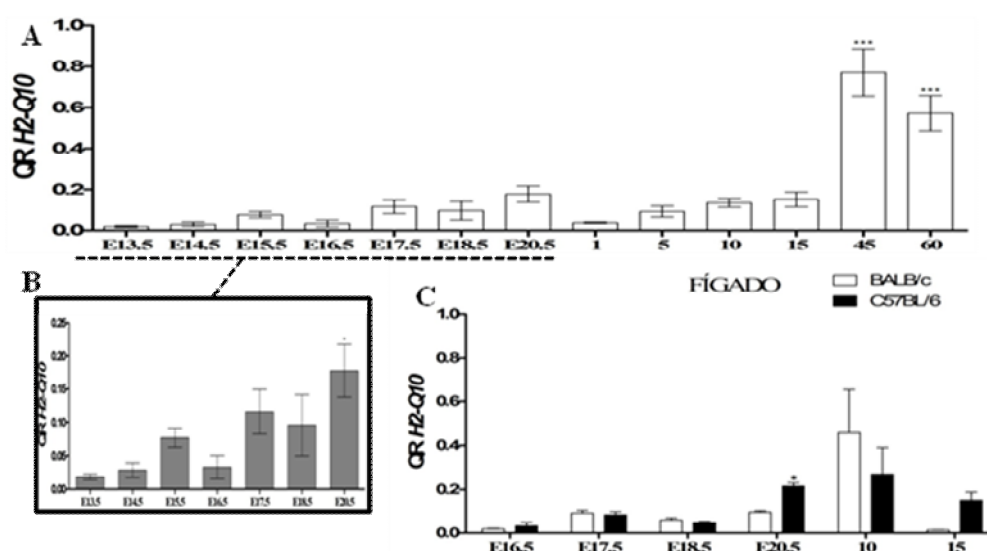
maior em comparação ao período fetal, **Figura 20 A**. Durante o período fetal, não foram observadas diferenças significantes nos níveis desse transcrito, apesar, de discretos aumentos em fígados fetais de animais com E13.5 e E14.5, **Figura 20 B**.



**Figura 20.** Perfil de expressão do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento do fígado. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q7* durante todo o desenvolvimento do fígado de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento fetal do fígado de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q7* durante o desenvolvimento do fígado de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos exposto em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

Entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c, foi observado que por volta do E16.5, animais da linhagem BALB/c expressaram níveis significativamente mais elevados ( $P=0,0234$ ) de *H2-Q7* em comparação a animais C57BL/6. Entretanto, em todos os outros períodos foi observado o contrário, com aumentos significantes em fígados de animais C57BL/6 com E17.5 dias ( $P=0,0125$ ), **Figura 20 C**.

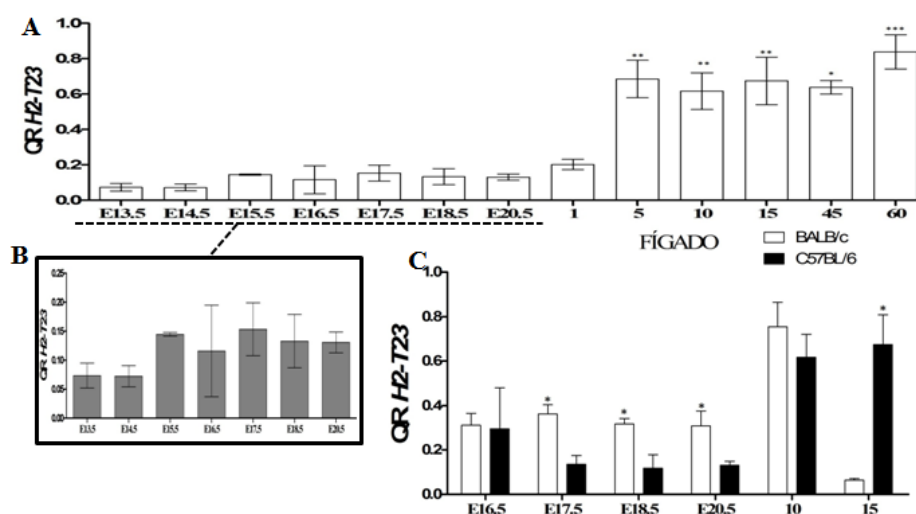
Os níveis de transcritos para *H2-Q10* foram significativamente mais elevados em fígados de animais adultos jovens com 45 e 60 dias ( $p < 0,001$ ), **Figura 21 A**. Durante o período fetal, observamos aumento significativo ( $p < 0,05$ ) por volta do E20.5 dia do desenvolvimento, **Figura 21 B**. Não foram observadas diferenças nos níveis de *H2-Q10* entre animais BALB/c e C57BL/6, com exceção do E20.5 dia de desenvolvimento fetal, em que os níveis de *H2-Q10* foram significativamente mais elevados em animais C57BL/6 ( $P=0,0020$ ), **Figura 21 C**.



**Figura 21.** Perfil de expressão do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento do fígado. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q10* durante todo o desenvolvimento do fígado de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento fetal do fígado de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q10* durante o desenvolvimento do fígado de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

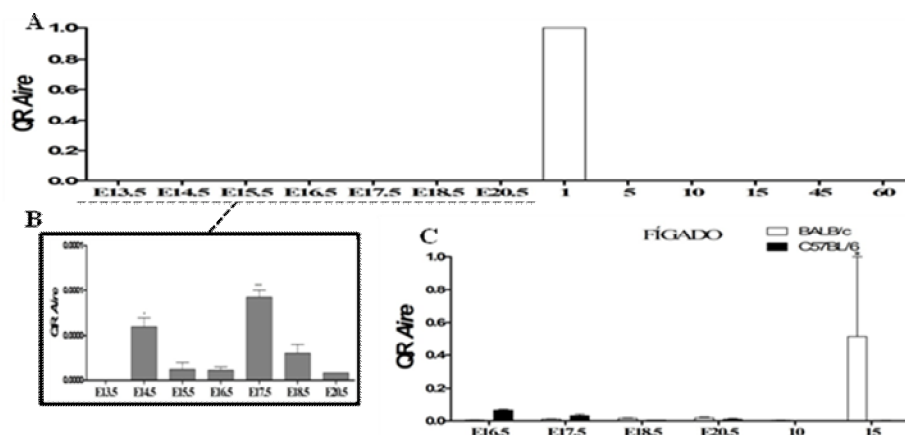
Para o gene *H2-T23*, em relação às outras idades, o perfil de expressão relativa do mRNA se mostrou diminuído durante o período fetal e perinatal e significativamente aumentado em fígados de animais com 5, 10, 15 ( $P < 0,01$ ), 45 ( $P < 0,05$ ) e 60 dias de idade ( $P < 0,001$ ), **Figura 22 A**. Não foram observadas diferenças nos níveis de expressão desse gene durante o período fetal de desenvolvimento do fígado, **Figura 22 B**. Em animais BALB/c observaram-se aumentos significantes em fígados fetais com E17.5, E18.5 e E20.5 dias, ( $P = 0,0057$ ,  $P = 0,0196$ ,  $P = 0,0174$ , respectivamente). Em animais com 15 dias, foi observado aumento significativo na expressão de *H2-T23* em fígados de animais da linhagem C57BL/6 ( $P < 0,001$ ), **Figura 22 C**.

Em relação ao gene *Aire*, a sua expressão em todas as amostras analisadas não apresentou diferenças. Todas as amostras apresentaram expressão do mRNA diminuída em relação ao calibrador (idade 1 dia), **Figura 23 A**. Todos os valores de expressão relativa do mRNA de *Aire* se mantiveram abaixo de 0,0001, apesar disso foi observado aumento significativo desse transcrito em fígados fetais com E14.5 e E17.5 dias ( $P < 0,05$ ), **Figura 23 B**. Não foram observadas diferenças nos níveis de *Aire* entre as linhagens. O aumento observado no dia 15 é referente ao calibrador, **Figura 23 C**.



**Figura 22.** Perfil de expressão do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento do fígado. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-T23* durante todo o desenvolvimento do fígado de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento fetal do fígado de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-T23* durante o desenvolvimento do fígado de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

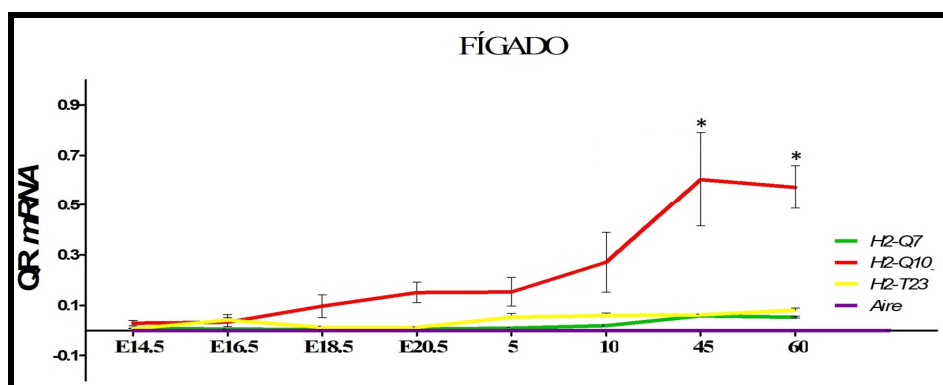
Em todos os períodos analisados no fígado, o gene *H2-Q10* foi o que se mostrou mais elevado, sendo significativamente aumentado em fígados de animais adultos jovens de 45 e 60 dias ( $P < 0,001$ ), **Figura 24.**



**Figura 23.** Perfil de expressão do gene *Aire* durante o desenvolvimento do fígado. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *Aire* durante todo o desenvolvimento do fígado de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *Aire* durante o desenvolvimento fetal do fígado de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *Aire* durante o desenvolvimento do fígado de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)



Os outros genes analisados, apesar de possuírem perfis de expressão semelhantes, com tendência ao aumento nos níveis de transcritos com o avanço da idade, se mostraram diminuídos neste órgão, **Figura 24**.



**Figura 24.** Perfis de expressão dos genes *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* durante o desenvolvimento do fígado em animais C57BL/6. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) estão representadas com (\*).

#### 5.3.4. PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA NO INTESTINO

A mucosa intestinal possui um sistema imune especializado na manutenção da homeostase imunológica sob constantes exposições a antígenos provenientes dos alimentos, de microrganismos comensais e também de patógenos invasores. Assim, acredita-se que este órgão seja um local de indução de diversos eventos envolvendo mecanismos de inibição da ação de células T.

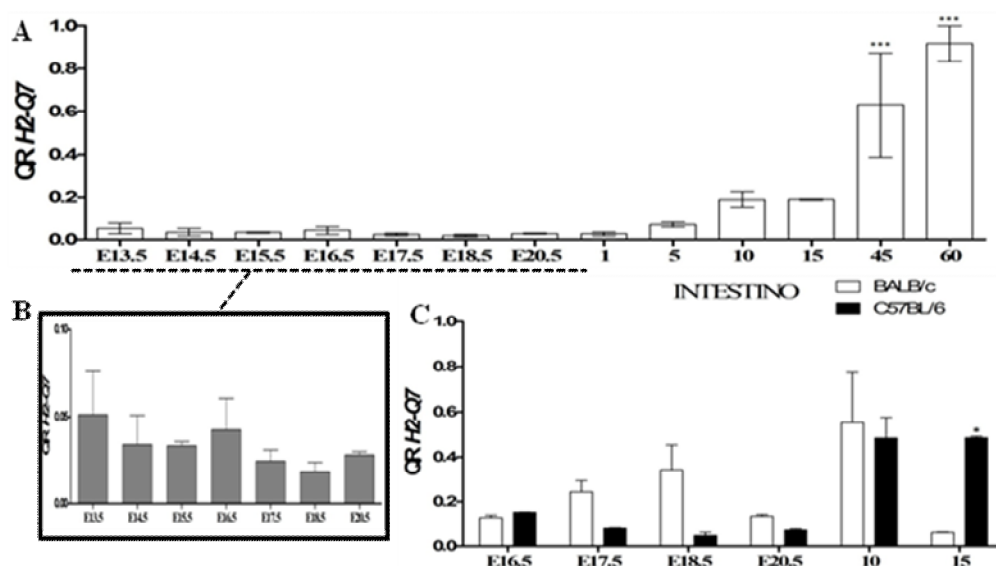
Em relação ao gene *H2-Q7*, quando a sua expressão relativa foi comparada entre as diferentes idades, observou-se significância somente nos níveis de mRNA em intestinos de animais adultos com 45 e 60 dias ( $P < 0,001$ ). Os níveis observados nessas idades foram cerca de 6 a 10 vezes mais elevados que os observados durante o período fetal e perinatal, **Figura 25 A**. De maneira geral, a expressão de *H2-Q7* se manteve diminuída e abaixo de 0.1 durante o período fetal e perinatal, **Figura 25 B**.

Não foram observadas diferenças significantes entre os perfis de expressão de *H2-Q7* de BALB/c e C57BL/6, exceto em intestinos de animais com 15 dias onde foram observados níveis mais elevados na linhagem C57BL/6 ( $P = 0,0002$ ). Embora não tenha

atingido significância, nos outros períodos analisados, os níveis de expressão de *H2-Q7* em BALB/c foram discretamente mais elevados do que em animais C57BL/6, **Figura 25 C**.

Para o gene *H2-Q10* a expressão relativa do mRNA se mostrou significativamente aumentada durante o período fetal, idades de E18.5 e E20.5 ( $P < 0,001$ ). Durante todos os outros períodos, a expressão desse gene se mostrou diminuída, **Figura 26 A e B**. Quando os perfis de expressão entre as linhagens foram comparados, observaram-se níveis elevados ( $P = 0,0210$ ) em intestinos de animais da linhagem C57BL/6 com E18.5 dias. Todavia, em animais com 10 dias de idade, foram observados níveis aumentados desse transcrito em animais da linhagem BALB/c ( $P = 0,045$ ), **Figura 26 C**.

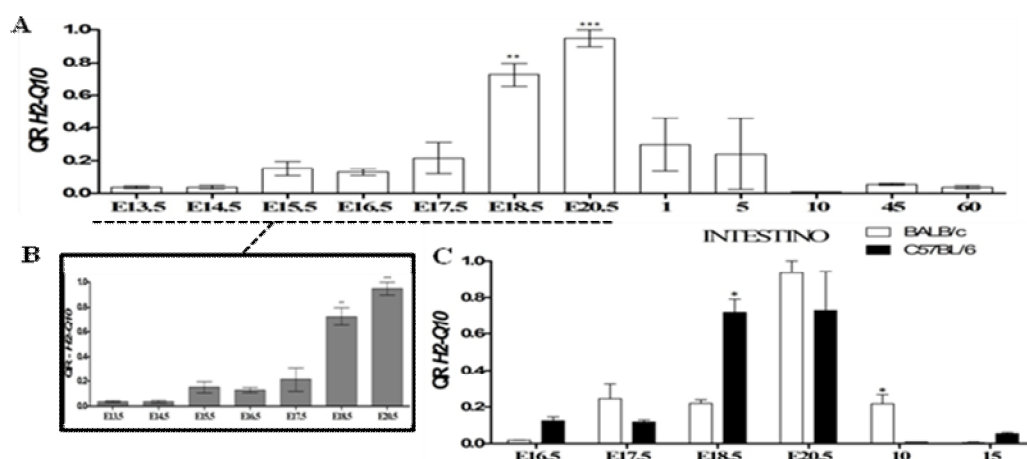
Em animais C57BL/6, quando comparados entre as diferentes idades, foram observadas elevações nos níveis de *H2-T23*, com diferenças significantes em animais com 45 ( $P < 0,05$ ) e 60 dias de idade ( $P < 0,001$ ), **Figura 27 A**. O perfil de expressão de *H2-T23* em intestinos fetais foi semelhante ao observado no adulto; aumentos gradativos nos níveis desse transcrito com o ganho de idade pelo animal. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes, **Figura 27 B**.



**Figura 25.** Perfil de expressão do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento do intestino. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento do intestino de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento fetal do intestino de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q7* durante o desenvolvimento do intestino de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

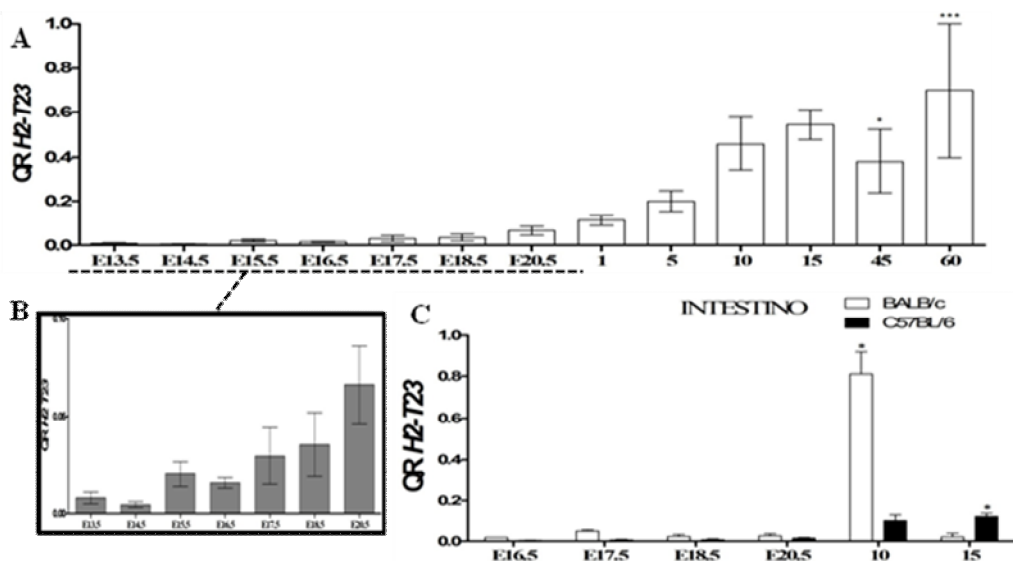
Em intestinos de animais BALB/c com 10 dias de idade, os níveis de *H2-T23* foram significativamente aumentados quando comparados aos valores observados para animais C57BL/6 ( $P < 0,0001$ ). Todavia, no período seguinte, animais C57BL/6 expressaram níveis mais elevados de *H2-T23* ( $P = 0,042$ ), **Figura 27 C**.

Em relação aos perfis de expressão de *Aire* no intestino (**Figura 28 A**), não foram observadas diferenças significantes entre as diferentes idades, exceto, em animais com 5 dias ( $P < 0,05$ ). De maneira geral, os níveis de expressão desse transcrito foram discretamente aumentados durante o período fetal. Nesse período, foram observados aumentos significantes nos níveis de *Aire* em intestinos com E13.5 e E16.5 dias de idade ( $P < 0,01$ ), **Figura 28 B**.

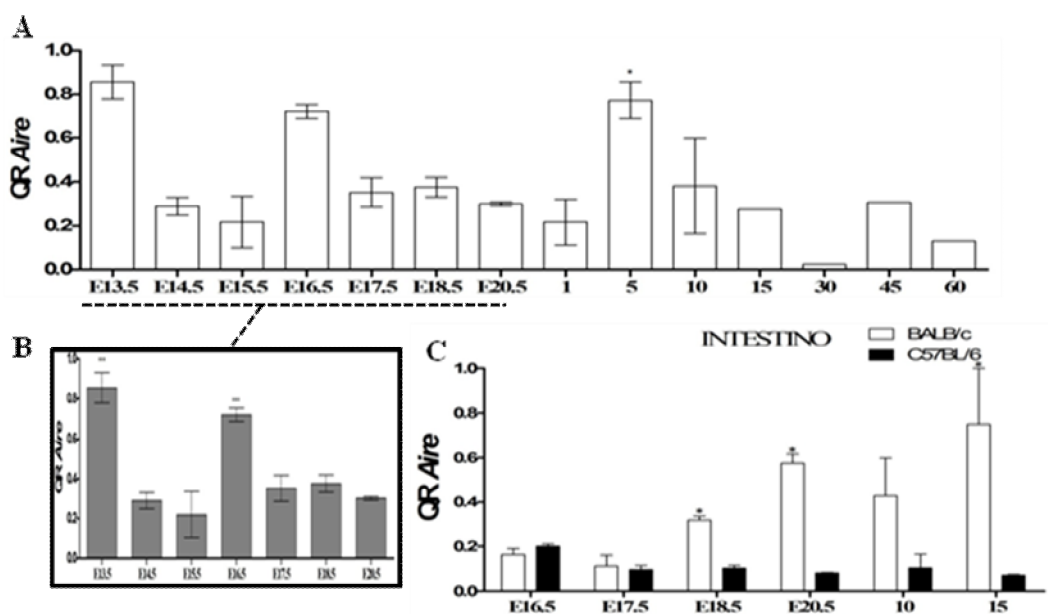


**Figura 26.** Perfil de expressão do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento do intestino. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento do intestino de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento fetal do intestino de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q10* durante o desenvolvimento do intestino de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)).

Os níveis de *Aire* em animais BALB/c se mostraram significativamente mais elevados em animais com E18.5, E20.5 e 15 dias ( $P = 0,0002$ ,  $P = 0,0067$  e  $P < 0,01$ , respectivamente) quando comparado aos níveis observados nos mesmos períodos em animais C57BL/6, **Figura 28 C**.



**Figura 27.** Perfil de expressão do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento do intestino. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento do intestino de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento fetal do intestino de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-T23* durante o desenvolvimento do intestino de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

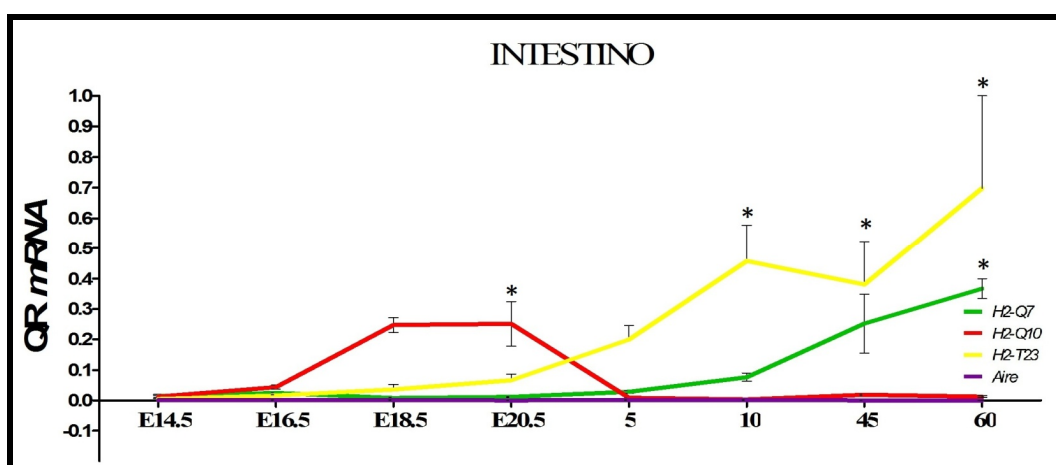


**Figura 28.** Perfil de expressão do gene *Aire* durante o desenvolvimento do intestino. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *Aire* durante o desenvolvimento do intestino de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de RNAm do gene *Aire* durante o desenvolvimento fetal do intestino de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *Aire* durante o desenvolvimento do intestino de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

Durante o período fetal e perinatal, entre os dias E16.5 e 3, dos genes analisados, *H2-Q10* foi o que se apresentou em maiores níveis, com aumento significativo em intestinos de animais com E20.5 dias de idade ( $P < 0,001$ ). Para os outros períodos, os níveis mais elevados observados foram do gene *H2-T23* com aumentos significantes em intestinos de animais com 10, 45 e 60 dias de idade ( $P < 0,001$ ).

O perfil de expressão do gene *H2-Q7* foi semelhante ao perfil gênico de *H2-T23*, sendo o segundo mais expresso em intestinos de animais adultos jovens. Foram observados aumentos gradativos nos níveis desses transcritos de acordo com o avanço de idade pelo animal.

Os níveis de transcritos para o gene *Aire*, ao longo do desenvolvimento do intestino, se mostraram bastante diminuídos, **Figura 29**.



**Figura 29.** Perfis de expressão dos genes *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* durante o desenvolvimento do intestino em animais C57BL/6. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) estão representadas com (\*).

### 5.3.5. PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA NA PLACENTA

Os tecidos embrionários, juntamente com a placenta, o cérebro e a câmara anterior do olho são sítios imunologicamente privilegiados onde ocorrem diversos mecanismos de inibição das respostas de células imunocompetentes [146]. Nesse contexto, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, a expressão de moléculas de classe Ib do MHC

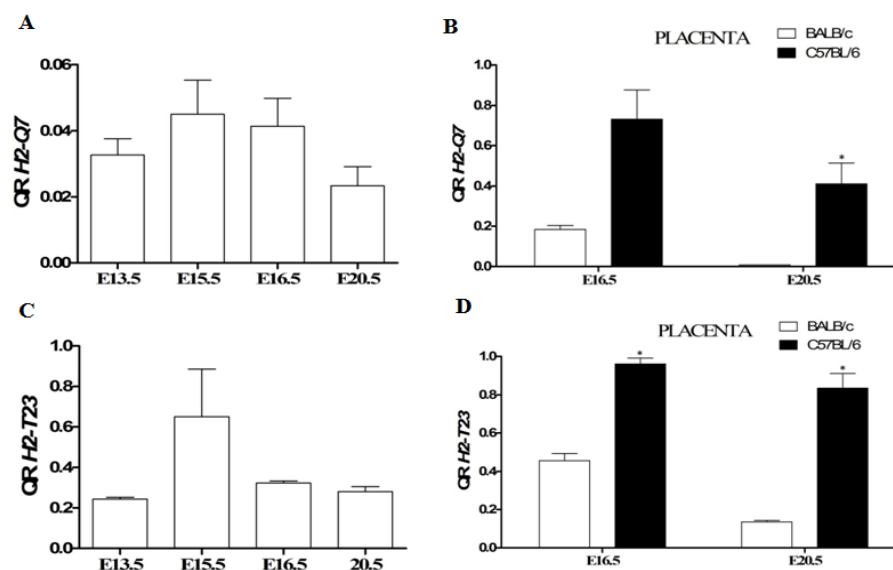
na placenta está associada à manutenção da sobrevivência dos fetos pela inibição da ação de células do sistema imune materno. Nós avaliamos a expressão dos genes *H2-Q7(Qa2)*, *H2-Q10(Qa10)*, *H2-T23(Qa1)* e *Aire* em placentas de animais C57BL/6 fêmeas com E13.5, E15.5, E16.5 e E20.5 dias de gestação.

A expressão do gene *H2-Q7* não mostrou diferenças significantes entre as idades avaliadas. Apesar disso, observou-se uma tendência de aumento nos níveis desse transcrito em placentas de animais com E15.5 e E16.5 dias e declínio desses níveis em placentas com E20.5 dias de gestação, **Figura 30 A**. Quando comparados entre as linhagens, os níveis de *H2-Q7* em placentas de animais C57BL/6 com E16.5 e E18.5 ( $P=0,00137$ ) dias de gestação foram mais elevados em comparação aos níveis observados em animais da linhagem BALB/c, **Figura 30 B**.

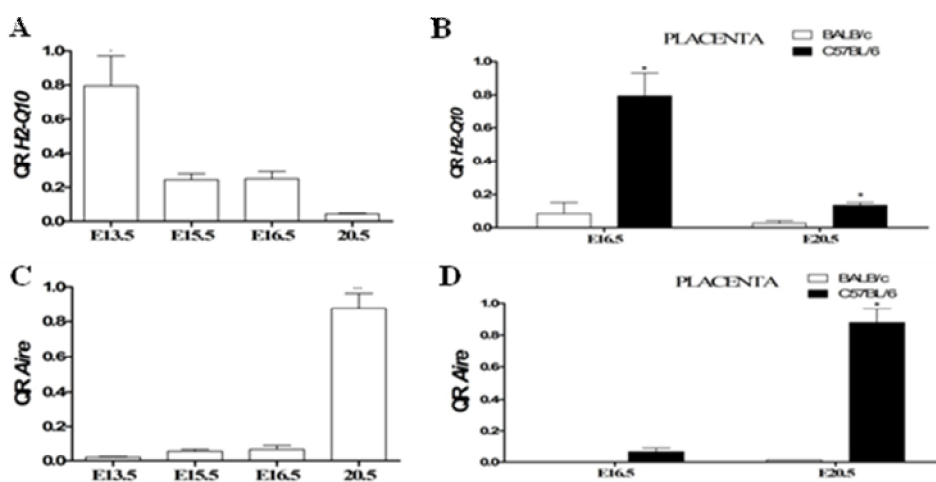
O perfil de expressão do mRNA de *H2-T23* foi similar ao observado para o gene *H2-Q7*, com um pronunciado aumento nos níveis de expressão em placentas com E15.5 dias de gestação e diminuição com o avanço da gestação. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes nos níveis de *H2-T23* neste órgão, **Figura 30 C**. De forma semelhante ao *H2-Q7*, a expressão de *H2-T23* foi significativamente aumentada em animais da linhagem C57BL/6, sendo cerca de 3 vezes mais elevada em placentas de animais C57BL/6 com E16.5 dias ( $P=0,004$ ) e cerca de 5 vezes em placentas com E20.5 dias de gestação ( $P=0,015$ ) em comparação a animais BALB/c, **Figura 30 D**.

A expressão do gene *H2-Q10*, em comparação entre as idades não mostrou diferenças, apesar do pronunciado aumento em placentas de animais com E13.5 dias de gestação, **Figura 31 A**. Em comparação aos níveis observados em animais BALB/c, observou-se níveis mais elevados de *H2-Q10* em placentas de animais C57BL/6 com E16.5 e E20.5 dias de gestação ( $P=0,0094$  e  $P=0,018$ , respectivamente), **Figura 31 B**.

Para o gene *Aire*, foram observados níveis significantemente aumentados em placentas de animais com E20.5 dias de gestação em comparação às outras idades, **Figura 31 C**. De forma semelhante aos outros genes analisados, a expressão de *Aire* foi significantemente mais elevada em animais da linhagem C57BL/6 com E20.5 dias de gestação ( $P=0,0009$ ), **Figura 31 D**.



**Figura 30.** Perfil de expressão gênica na placenta durante a evolução da gestação. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q7* em placentas de animais C57BL/6. **B.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q7* em placentas de animais C57BL/6 e BALB/c. **C.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-T23* em placentas de animais C57BL/6 e BALB/c. **D.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-T23* em placentas de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

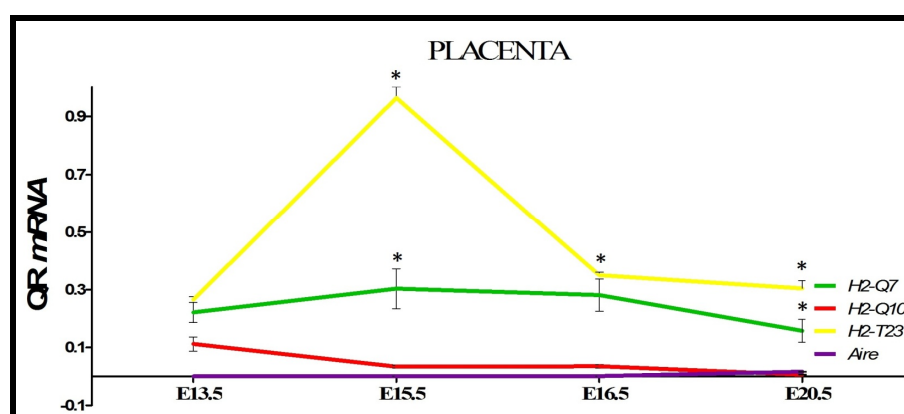


**Figura 31.** Perfil de expressão gênica na placenta durante a evolução da gestação. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de RNAm do gene *H2-Q10* em placentas de animais C57BL/6. **B.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q10* em placentas de animais C57BL/6 e BALB/c. **C.** Quantificação relativa de RNAm do gene *Aire* em placentas de animais C57BL/6. **D.** Comparação dos perfis de expressão de *Aire* em placentas de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

Durante a evolução na gestação, o gene que se mostrou significativamente mais expresso na placenta de animais C57BL/6 foi o *H2-T23* ( $P < 0,001$ ). Em placentas de animais

com E15.5 dias de gestação, esse gene foi cerca de 3 vezes mais expresso que o gene *H2-Q7*, na ordem o segundo mais expresso, **Figura 32**.

O gene *H2-Q7* se mostrou significativamente aumentado quando comparado aos genes *H2-Q10* e *Aire*, cuja expressão na placenta se mostrou diminuída em todos os períodos avaliados. Interessantemente, os níveis de *H2-Q7* foram menores que os de *H2-T23* em todos os períodos analisados, **Figura 32**.



**Figura 32.** Perfis de expressão dos genes *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* durante a evolução da gestação em placentas de C57BL/6. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) estão representadas com (\*).

### 5.3.5. PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA NO CÉREBRO

Nesse estudo, também foi avaliada a expressão de *H2-Q7*(Qa2), *H2-Q10*(Qa10), *H2-T23*(Qa1) e *Aire* em outro sítio imunoprivilegiado, o cérebro, de animais das linhagens C57BL/6 e BALB/c de diferentes idades, **Figuras 37 a 41 (APÊNDICE B)**.

Embora tenham sido encontrados níveis bastante diminuídos desses transcritos no cérebro, em nenhuma das idades avaliadas, foi atingido significância. Em relação aos perfis de expressão de *H2-Q7*, foram observados aumentos nos níveis desse transcrito em cérebros de animais C57BL/6 durante o período perinatal, **Figura 37 A**.

Tanto para *H2-Q10*, quanto para *H2-T23*, os perfis de expressão dos mRNA de ambos, se mostraram bastante diminuídos em todos os períodos analisados. Os aumentos



observados no dia E20.5 para *H2-Q10* e 5 para *H2-T23*, são representativos da amostra calibradora, **Figuras 38 A e 39 A**.

Em relação ao perfil de expressão do gene *Aire* no cérebro, embora não significativa, foram observados níveis discretamente aumentados desse transcrito durante o período fetal, entre os dias E13.5 e E16.5, em relação as outras idades avaliadas, **Figura 40 A**.

De maneira geral, não foram observadas diferenças significantes entre os níveis de mRNA de *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* entre os animais das linhagens C57BL/6 e BALB/c, **Figuras 37 C a 40 C**. Da mesma forma, quando comparados, os níveis de expressão entre os diferentes transcritos não mostraram nenhuma diferença significativa no cérebro de animais C57BL/6, **Figura 41**.

### 5.3.7. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA ENTRE OS ÓRGÃOS

Com o objetivo de verificar quais foram os órgãos que expressaram níveis mais elevados de transcritos para *H2-Q7(Qa2)*, *H2-Q10(Qa10)*, *H2-T23(Qa1)* e *Aire*, comparamos os níveis de expressão desses mRNA nos 6 diferentes órgãos estudados em diferentes períodos (§).

De maneira geral, o timo foi o órgão no qual foram observados os mais elevados níveis de expressão do gene *H2-Q7*. Foram observados níveis aumentados desse transcrito no timo de animais C57BL/6 na maioria dos períodos analisados, com aumentos significantes em timo de animais com E16.5 ( $P < 0,05$ ) e 60 dias de idade ( $P < 0,01$ ), **Figura 33**.

Durante o período fetal, a expressão de *H2-Q7* em timos de animais com E16.5 dias foi cerca de 10 vezes mais elevada do que a observada nos outros órgãos durante todo esse período. Em animais adultos (60 dias) os níveis de *H2-Q7* foram cerca de 10 vezes mais elevados do que a observada em timos de animais em todas as outras idades analisadas e mais de 100 vezes do que a observada em outros órgãos como placenta, fígado e intestino durante o período fetal. Em animais adultos, embora não significativa, depois do timo o baço foi o órgão que mais expressou *H2-Q7*, seguido do fígado e intestino. Não foram detectados níveis consideráveis desse transcrito no cérebro, **Figura 33**.

§Para timo, fígado, intestino e cérebro, os níveis de mRNA foram avaliados em animais C57BL/6 com E16.5, E18.5, E20.5, 10, 15 e 60 dias de idade. Para baço, somente animais com 10, 15 e 60 dias e para placenta, animais com E16.5 e E20.5 dias de gestação.

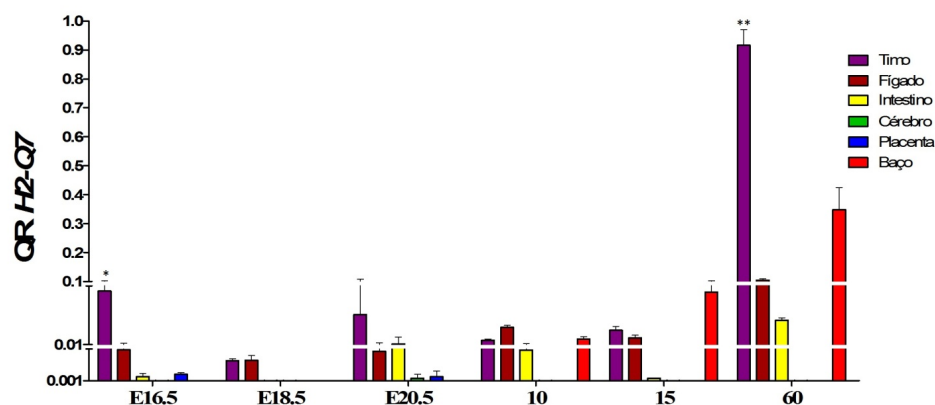
Para o transcrito de *H2-T23*, foram observados aumentos significantes somente em fígados de animais adultos (60 dias) ( $P < 0,01$ ) em comparação ao período fetal. Durante esse período, os níveis de mRNA de *H2-T23* se mostraram discretamente mais elevados em fígado e placenta e equivalentes entre timo e intestino. De acordo com o ganho de idade pelo animal, foram observados aumentos gradativos na expressão de *H2-T23* em fígado, baço e intestino. Os níveis desse transcrito em timos de animais adultos se mantiveram equivalentes aqueles observados em timos fetais. Embora sem atingir significância, intestino e fígado foram os órgãos onde foram observados os níveis mais aumentados de *H2-T23*, seguido do baço e do timo. Foram detectados níveis diminuídos desse transcrito, durante todos os períodos analisados, em cérebros de animais C57BL/6 em comparação aos outros órgãos, **Figura 34**.

O fígado foi o único órgão em que foram detectados níveis significantes de *H2-Q10* ( $P < 0,01$ ). Foram observados aumentos gradativos nos níveis desse transcrito de acordo com o avanço da idade, sendo que os níveis mais elevados de *H2-Q10* foram observados na fase adulta (60 dias). Durante o período fetal, tanto o timo quanto o intestino expressaram níveis diminuídos desse transcrito em comparação aos níveis observados em fígados de idades semelhantes. Nos órgãos restantes, não foram observados níveis consideráveis de *H2-Q10*, **Figura 35**.

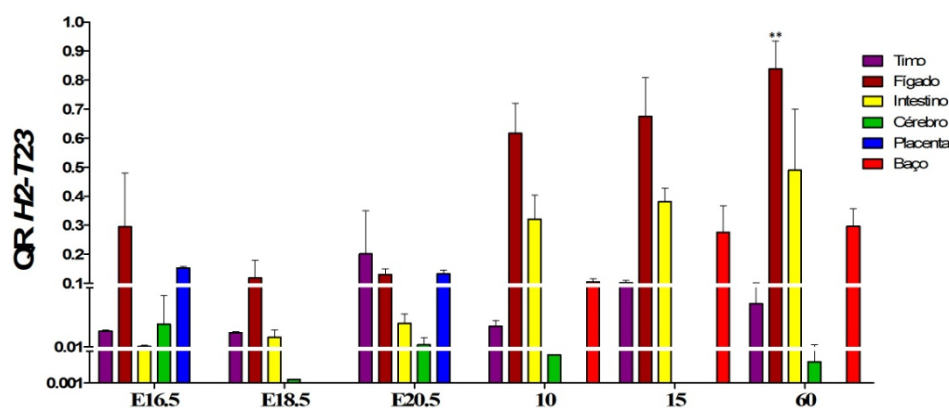
Em relação ao gene *Aire*, os níveis mais elevados desse transcrito foram detectados em timos durante o período fetal. Em timos de animais com E16.5 dias, os níveis de *Aire* foram significativamente aumentados ( $P < 0,001$ ) e cerca de 10 vezes mais elevados quando comparados aos níveis observados em outros períodos, **Figura 36**.

Durante o período fetal, foram detectados níveis diminuídos de mRNA de *Aire* em placenta, intestino e cérebros de animais com E16.5 e E20.5 dias de idade. Embora não tenha atingido significância, foram observados aumentos na expressão de mRNA de *Aire* em baços de animais adultos em níveis semelhantes aos do timo de mesma idade, **Figura 36**.

No presente estudo também comparamos os níveis de expressão gênica de *H2-Q7(Qa2)*, *H2-Q10(Qa10)*, *H2-T23(Qa1)* e *Aire* em animais da linhagem BALB/c em diferentes idades fetais e pós-natais (E16.5, E18.5, E20.5, 10 e 15). As figuras relativas a essa análise encontram-se no **APÊNDICE C**.

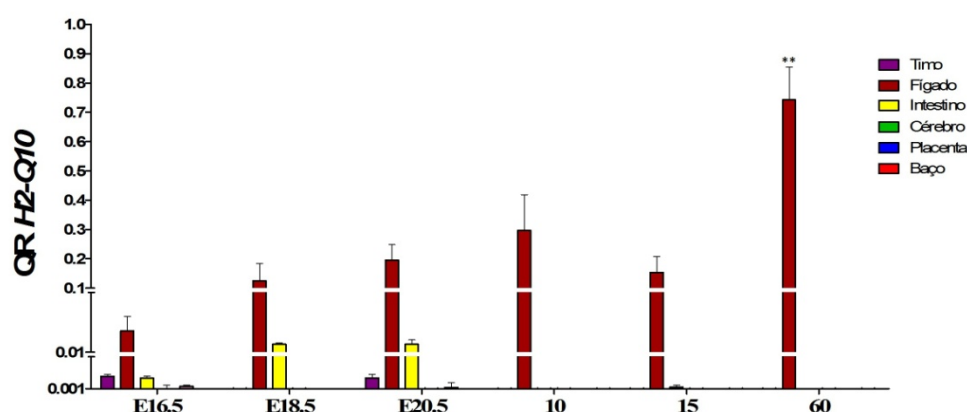


**Figura 33.** Quantificação relativa do RNAm de *H2-Q7* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais C57BL/6. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,01$ ) estão representadas com (\*\*) e ( $p < 0,05$ ) com (\*). §Para baço os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades 10, 15 e 60 dias. Para placenta, os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades E16.5 e E20.5 dias.

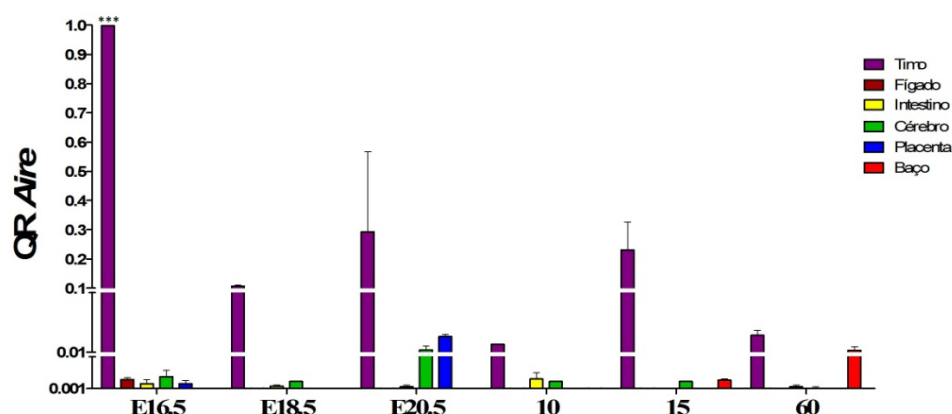


**Figura 34.** Quantificação relativa do RNAm de *H2-T23* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais C57BL/6. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,01$ ) estão representadas com (\*\*) e ( $p < 0,05$ ) com (\*). §Para baço os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades 10, 15 e 60 dias. Para placenta, os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades E16.5 e E20.5 dias.

Semelhantemente a animais C57BL/6, o órgão que expressou os níveis mais elevados de transcritos para o *H2-Q7* foi o timo. Foi observado aumento significativo ( $P < 0,01$ ) nos níveis desse transcrito em timo de animais com 15 dias de idade em comparação aos outros órgãos e idades. Durante o período fetal, timo, fígado e intestino foram, respectivamente, os órgãos que mais expressaram *H2-Q7*. Já em idades pós-natais, foram observados aumentos nos níveis no baço de animais com 10 e 15 dias, **Figura 42**.



**Figura 35.** Quantificação relativa do RNAm de *H2-Q10* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais C57BL/6. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,01$ ) estão representadas com (\*\*) e ( $p < 0,05$ ) com (\*). §Para baço os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades 10, 15 e 60 dias. Para placenta, os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades E16.5 e E20.5 dias.



**Figura 36.** Quantificação relativa do RNAm de *Aire* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais C57BL/6. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,01$ ) estão representadas com (\*\*\*) e ( $p < 0,05$ ) com (\*). §Para baço os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades 10, 15 e 60 dias. Para placenta, os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades E16.5 e E20.5 dias.

Para os transcritos de *H2-Q10*, foram observados aumentos significantes em fígados de animais BALB/c com E20.5, 10 e 15 dias, ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente). Assim como em animais C57BL/6, em todos os períodos analisados, o fígado foi o órgão que expressou os níveis mais elevados desse transcrito, seguido pelo intestino. Não foram encontrados níveis consideráveis de mRNA de *H2-Q10* nos órgãos restantes, **Figura 43**.

Os níveis de mRNA de *H2-T23* foram significativamente mais elevados em intestinos de animais BALB/c com 10 dias ( $P < 0,01$ ). Diferentemente de animais C57BL/6, cuja expressão se deu em maior nível em fígados de animais adultos, a expressão de *H2-T23* foi, na maioria dos períodos analisados, mais elevada em intestinos, seguido do fígado e timo, **Figura 44.**

Em relação aos níveis de mRNA de *Aire*, assim como em animais C57BL/6, o timo foi o único órgão em que foram detectáveis aumentos significantes desse gene. Foi observado grande aumento ( $P < 0,001$ ) nos níveis desse transcrito durante o período fetal, em animais com E18.5 dias de idade. Observou-se diminuição dos níveis de *Aire* de acordo com a idade pelo animal. Diferentemente de animais C57BL/6, *Aire* não foi observado em baços de animais jovens, entretanto, observaram-se em todos os períodos analisados, níveis diminuídos desse transcrito em outros órgãos, como intestino e cérebro, **Figura 45.**

# Discussão

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como finalidade caracterizar a expressão de genes relacionados com a modulação do sistema imune por intermédio da indução de tolerância imunológica durante o desenvolvimento do timo, de órgãos linfóides secundários e de sítios imunologicamente privilegiados em animais C57BL/6 e BALB/c. Em adição, foram correlacionados os níveis de expressão desses genes com os principais eventos biológicos que ocorrem em cada uma das fases do desenvolvimento desses órgãos, com ênfase particularmente no timo. Muitos dos resultados obtidos ao longo deste estudo são pioneiros e procuram contribuir com os estudos que reavaliam as bases da geração da tolerância imunológica.

### *6.1 Perfis de expressão gênica de H2-Q7(Qa2), H2-Q10(Qa10), H2-T23(Qa1) e Aire no timo.*

Embora genes não-clássicos do MHC classe I estejam envolvidos em algumas funções compartilhadas por outros genes de classe Ia, preferencialmente, esses genes possuem funções mais especializadas nas respostas imunes. Esse é o caso de Qa-1 (*H2-T23*) que está envolvido na supressão de respostas de células TCD4<sup>+</sup> e NK, por intermédio da interação com receptores CD94/NKG2A<sup>[94]</sup>, além da indução de células TCD8<sup>+</sup> reguladoras<sup>[94, 98]</sup>, e ainda, da molécula Qa-2 (*H2-Q7*) que, possivelmente, está envolvida na inibição da ação de células NK maternas contra as células do feto<sup>[67,72,85]</sup>. Dessa forma, acredita-se que a expressão dessas moléculas no timo poderia estar intimamente envolvida nos processos de seleção positiva e negativa do repertório de timócitos e, por conseqüência, influenciando as respostas imunes na periferia<sup>[29, 49]</sup>.

Em humanos, evidências apontam que a expressão do HLA-G pelas mTECs poderia resultar em eventos de tolerância imunológica dirigidos às células T antígeno-específicas, por intermédio da geração de células T regulatórias naturais CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup><sup>[15, 16]</sup>, ou ainda, pela indução de apoptose de células T CD8<sup>+</sup> via expressão de Fas<sup>[15, 49]</sup>.

Em nosso estudo, o gene *H2-Q7* foi o que se mostrou mais expresso no timo em relação aos genes estudados. Além disso, interessantemente, o timo foi o órgão que mais expressou o transcrito desse gene, em comparação aos demais órgãos. Esses resultados são

bastante interessantes já que ainda não há na literatura trabalhos mostrando o timo como sendo o sítio de maior expressão de Qa-2, principalmente, em timos de animais adultos.

Neste trabalho, observamos níveis bastante elevados de RNAm do *H2-Q7* em timos de animais adultos jovens com 45 e 60 dias de idade. Observamos, ainda, que o aumento nos níveis de *H2-Q7* obedeceu a um padrão distinto de expressão, caracterizado pelo aumento gradativo nos níveis de transcritos com o avanço da idade do animal. Esses resultados corroboram dados que afirmam que a expressão de Qa-2 pode ser identificada em altos picos de expressão, cerca de 3 semanas após o nascimento do animal <sup>[148]</sup>.

A maior expressão de *H2-Q7* em timos de animais adultos, observada neste estudo, pode ser explicada por evidências que apontam os linfócitos T maduros e/ou ativados como as principais fontes de Qa-2 <sup>[61,73,74,88]</sup>. A expressão de Qa-2 por timócitos e linfócitos T está intimamente relacionada com o amadurecimento fenotípico e funcional dessas células e contribuem para os seus mecanismos de ação, como a produção de citocinas e lise mediada por granzima A <sup>[87, 88]</sup>.

Acreditamos que em animais adultos, essas células poderiam estar formando um *pool* de emigrantes tímicos amadurecidos recém-submetidos aos processos de seleção e residentes da medula tímica <sup>[88]</sup>. Ainda, assim como proposto para o HLA-G <sup>[49,126]</sup>, a maior expressão de *H2-Q7*(Qa2) nesse período, poderia estar relacionada com a inibição de células NK, presentes no timo, capazes de destruir frações de timócitos que expressam baixas densidades de moléculas de classe I na superfície <sup>[126]</sup>. De maneira geral, mostramos que apesar da involução tímica, a expressão de *H2-Q7* nesse órgão é bastante elevada em timos de animais adultos, mantendo a função do órgão nessa fase da vida.

Na fase fetal, durante a ontogênese do timo, a expressão de moléculas do MHC de classe I e classe II é crucial para a educação e seleção do repertório dos linfócitos <sup>[128]</sup>. O timo fetal precoce, do E13.5 ao 17.5 dia pós-coito, é composto por uma população homogênea de células T precursoras que apresentam-se com fenótipo CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> duplo negativo (DN). Entretanto, a partir do E18.5 dia pós-coito essa população, gradualmente, passa a adquirir marcadores fenotípicos assemelhando-se aos precursores de linfócitos T CD4<sup>low</sup> do adulto <sup>[130]</sup>. Essas características permitem o reconhecimento e a interação do receptor de célula T com o complexo MHC-peptídeo, permitindo a ocorrência da seleção positiva e negativa nessas células <sup>[130]</sup>.



Durante o período fetal, observamos aumento dos níveis de mRNA de *H2-Q7* em timos fetais com E20.5 dias, em comparação aos níveis observados em idades anteriores. Nesse período, os processos de seleção positiva e negativa estão ocorrendo no repertório de timócitos DP, estimando-se que 81 % dessas células expressam Qa-2 de maneira constitutiva [73]. Assim, é possível que os elevados níveis de expressão do *H2-Q7*, nesse período, poderiam ser indicativos do seu envolvimento para geração de timócitos restritos ao reconhecimento de antígenos apresentados pelo Qa-2.

Durante o desenvolvimento inicial do timo (E14.5 – E16.5), nenhuma população de timócitos expressa níveis significantes de CD4. A aquisição gradual de CD4 ocorre até o dia E18.5 quando, então, se iniciam os processos de seleção positiva [130]. Além disso, dados recentes têm mostrado que esse período (E16.5-E18.5) está relacionado com o início da recombinação V(D)J do TCR em timócitos DN, e ainda, com o início da expressão gênica promíscua coordenada pelo *Aire* [129]. Em nosso estudo, entre as idades E14.5 e E16.5, os níveis de mRNA de *H2-Q7* se mantiveram constantes, concordando com dados que mostram a expressão de Qa-2 por subpopulações de timócitos imaturos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN [73]. Apesar de não atingir significância, acreditamos que a expressão de *H2-Q7* nessa fase da ontogênese do timo, possivelmente possa estar envolvida com os processos de seleção positiva dos timócitos que ocorre nos estágios subseqüentes da diferenciação tímica.

A baixa expressão de *H2-Q7* observada durante o período fetal, em comparação ao adulto, pode estar associada com expressão diminuída de moléculas de classe Ia por timócitos corticais, já que o padrão de expressão de Qa-2 por timócitos em desenvolvimento é semelhante ao observado para moléculas clássicas como *H2-K* [73]. De maneira geral, os resultados observados durante o período fetal, principalmente para o E20.5 dia de desenvolvimento tímico, corroboram os estudos que apontam o Qa-2 como marcador de timócitos medulares nos estágios finais de desenvolvimento [74, 88, 89]. Em adição, é bastante aceitável o papel de Qa-2 na educação de tímica de células T, já que são descritos subtipos de células T CD8<sup>+</sup> periféricas educadas exclusivamente no contexto de moléculas de classe Ib do MHC [88].

Em nosso estudo, observamos diminuição nos níveis de mRNA de *H2-Q7* no timo de animais recém-nascidos. O período perinatal é uma fase crítica na ontogênese do timo e está relacionado com os mecanismos que atuam na prevenção da autoimunidade [117]. A baixa

expressão do Qa-2 nessa fase pode estar relacionada com os processos de seleção negativa de timócitos que ocorrem durante os 15 primeiros dias após o nascimento do animal. Durante esse período, os timócitos são submetidos a modulações fenotípicas e funcionais e o ganho na expressão de Qa-2, permite a migração dos timócitos maduros para a periferia [74,88,89]. Interessantemente, observamos aumentos significantes na expressão do mRNA de *H2-Q7* em timos de animais com 45 dias. Esse aumento na expressão pode ser representativo da formação dos conjuntos de timócitos funcionalmente amadurecidos.

Na maioria das idades analisadas em nosso estudo, a expressão de *H2-Q7* no timo foi significativamente mais elevada nos animais da linhagem C57BL/6. Isso pode refletir o fato de que os animais da linhagem BALB/c, normalmente, expressem níveis mais baixos de Qa-2 por possuírem a deleção dos loci *H2-Q6* e *H2-Q9*, e assim, caracterizados como médio produtores de Qa-2 (Qa2<sup>med</sup>)<sup>[61]</sup>. Estima-se que essas diferenças genéticas entre BALB/c e C57BL/6, aparentemente, possam contribuir para diferenças de cerca de 4 a 5 vezes na quantificação da expressão gênica entre essas duas linhagens, visto que ambos os genes *Q7* e *Q9*, sinergicamente, contribuem para maiores níveis de expressão de Qa-2<sup>[61]</sup>.

De maneira semelhante, o timo fetal humano (14 a 22 semanas), expressa baixos níveis de células positivas para o HLA-G. Em timos de fetos e de indivíduos jovens, os níveis mais elevados de HLA-G são, predominantemente, encontrados na medula tímica<sup>[126]</sup>.

Em relação aos níveis de *H2-Q10* no timo e em todos os outros órgãos (com exceção do fígado), esse transcrito se mostrou pouco expresso e bastante reduzido em comparação aos outros genes analisados. Essa baixa expressão do mRNA de *H2-Q10* em órgãos linfóides, corroboram os achados de outros trabalhos que apontam Qa10 como específico do fígado [90, 91, 92, 93].

Todavia, durante o período fetal, observamos aumentos significantes nos níveis desse transcrito em timo de idades iniciais E15.5 e E16.5, período correlacionado com os eventos de recombinação V(D)J e início da PGE, e em timos fetais de E19.5 e E20.5 dias, período correlacionado com os eventos de seleção positiva e negativa. Além disso, observamos aumentos significativos de *H2-Q10* em timos no período perinatal.

Os aumentos nos níveis de mRNA de *H2-Q10* em períodos importantes do desenvolvimento tímico, nos leva a especular sobre a participação desse gene na geração de células TCD8<sup>+</sup>, restritas a antígenos apresentados no contexto de Qa10. Adicionalmente, os

nossos resultados concordam com estudos que citam a participação de Qa10 na manutenção da tolerância periférica, possivelmente pela inibição de células NK e TCD8<sup>+</sup> [91, 92, 93]. A expressão de Qa10, aparentemente, pode contribuir para a melhor aceitação de aloenxertos, principalmente hepáticos, e também, para a atenuação de processos autoimunes por meio da inibição de clones de células T restritas ao Qa10 [92, 93].

De forma semelhante ao *H2-Q7*, a expressão de *H2-Q10* no timo foi significativamente mais elevada em animais C57BL/6 na maioria das idades analisadas, principalmente durante a fase fetal. Ainda não há na literatura estudos que comparem a expressão desse gene entre as diferentes linhagens. Nós demonstramos aqui, que o timo de animais C57BL/6 expressam níveis mais elevados de mRNA de *H2-Q10* do que animais BALB/c.

Em relação ao gene *H2-T23*, que codifica a molécula Qa-1, nossos resultados mostraram poucas variações nos níveis de mRNA entre as diferentes idades analisadas. Observamos aumentos significativos em animais com 5, 15, 45 e 60 dias, entretanto, esses níveis foram somente pouco mais elevados em relação aqueles observados durante o período fetal.

Em comparação ao *H2-Q7*, a expressão de *H2-T23* no timo ocorreu em níveis cerca de 6 a 100 vezes menores. Acreditamos que esse padrão de expressão observado para o *H2-T23* se deva ao fato de que Qa-1 seja expresso, em sua maior parte, por APCs e células T ativadas, durante a fase efetora da resposta imune [94,95,98]. Além disso, em comparação ao timo, a expressão de *H2-T23*, na maioria dos períodos analisados, ocorreu em níveis mais elevados em outros órgãos, como no intestino e no fígado, corroborando os achados de estudos que apontam a participação de Qa-1 na regulação da autoimunidade na periferia [98,99,100].

Durante o período fetal, a expressão de *H2-T23* se manteve aparentemente constante em todas as idades analisadas. Como os níveis observados de mRNA de *H2-T23*, nessa fase, ocorreram de forma semelhante em animais adultos, acreditamos que a expressão de *H2-T23* ao longo do desenvolvimento do timo, seja importante para a geração de clones de células T restritas ao Qa-1. Essa proposição é baseada nos diversos estudos que mostram a necessidade da especificidade do reconhecimento de antígenos apresentados exclusivamente no contexto das moléculas Qa-1 por células T CD8<sup>+</sup> [94,96,99]. Além disso, a

seleção e maturação de células TCD8<sup>+</sup>, dependentes de Qa-1 no timo, está envolvida com a geração e ativação de células TCD8<sup>+</sup> regulatórias na periferia. Os mecanismos efetores de subpopulações de células TCD8<sup>+</sup> reguladoras são dependentes do reconhecimento de Qa-1 presente nas células-alvo [94,97,98]. A seleção intratímica de células TCD8<sup>+</sup> restritas ao Qa-1 requer a expressão de Qa-1, mas não necessita da expressão do Qdm. Em contraste da seleção de timócitos restritos as moléculas de classe I convencionais, a expressão de Qa-1 por células hematopoéticas é suficiente para a seleção positiva no timo [63].

Neste estudo, os animais BALB/c expressaram níveis significativamente mais elevados de mRNA para *H2-T23*, tanto no timo quanto no fígado e intestino, na maioria das idades analisadas, em comparação a animais C57BL/6. Acreditamos que, devido ao claro envolvimento de Qa-1 na geração de células T regulatórias, esse padrão de expressão de *H2-T23*, mais elevado em animais BALB/c, poderia estar relacionado com a maior susceptibilidade desses animais a infecções por *Mycobacterium* e outros agentes biológicos intracelulares [149, 150, 151, 152].

Em humanos, levanta-se a possibilidade de que no timo, o HLA-E poderia interagir com TCRs específicos presentes em timócitos, já que a estrutura da molécula HLA-E é bastante semelhante a das moléculas de classe Ia clássicas. Esse reconhecimento poderia gerar a deleção de clones autorreativos de timócitos por meio do reconhecimento de antígenos específicos, restritos à apresentação pelo HLA-E [134].

Estudos recentes de análise do perfil de expressão gênica no sistema imune mostram que os processos de diferenciação e maturação, bem como a ativação de linfócitos, são acompanhados por ondas de expressão paralela de centenas de genes. Nesse processo, o gene *Aire* desempenha papel central já que ele está diretamente implicado no controle da expressão de milhares de antígenos tecido-específicos provenientes de diversos órgãos da periferia [116]. No presente estudo, observamos aumentos significantes na expressão de *Aire* por volta do E16.5 de desenvolvimento tímico em animais C57BL/6. Nesse período, o aumento na expressão nos níveis do mRNA de *Aire* foi cerca de 5 vezes maior em comparação aos níveis observados nas idades anteriores. No entanto, em idades posteriores a E17.5, os níveis de *Aire* permaneceram diminuídos. Esses resultados estão em concordância com estudos envolvendo a análise da ontogenia do timo, mostrando que o surgimento de mTECs embrionárias expressando *Aire* surge anteriormente ao aparecimento

de tímócitos maduros CD4<sup>+</sup>TCR<sup>hi</sup> /CD8<sup>+</sup> TCR<sup>hi</sup>, ou seja, por volta do E16.5 dia de gestação, e ainda, depende da expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ -T e da sinalização do NF-kB e RANK-RANKL por células indutoras de tecido linfóide (LTis)<sup>[131]</sup>.

Em animais da linhagem BALB/c, o aumento na expressão de *Aire* ocorreu por volta do dia E18.5 e, em animais C57BL/6, como relatado anteriormente, por volta do E16.5 dia de desenvolvimento tímico. Esses resultados estão de acordo com achados prévios do nosso grupo que mostram que em animais C57BL/6, a PGE pode ser observada logo no início dos processos de recombinação V(D)J do TCR, por volta do E16.5, e em animais BALB/c, logo após a recombinação, por volta do E18.5 dia<sup>[132]</sup>. Assim, o tempo de amadurecimento das células T durante a ontogenia do timo, aparentemente, é diferente entre as linhagens de camundongo, sugerindo importante papel do *background* genético na modulação deste fenômeno nas diferentes linhagens murinas<sup>[132]</sup>.

Assim como para o gene *H2-T23*, os níveis de transcrito para *Aire* foram significativamente mais elevados, na maioria dos períodos analisados, em animais da linhagem BALB/c. Acreditamos que, assim como para o Qa-1, a maior expressão de *Aire* nesses animais, possivelmente, poderia estar relacionada com a maior susceptibilidade dessa linhagem a infecções causadas por diversos patógenos intracelulares, em comparação aos animais C57BL/6<sup>[149, 150, 151, 152]</sup>. Levantamos essa possibilidade, baseados em evidências que mostram que o gene *Aire*, além de ser o regulador da tolerância central realizada no timo, aparentemente, possui função importante no modelamento do repertório de células T reguladoras<sup>[60]</sup>. Ainda não está claro se *Aire* possui efeito direto no estabelecimento do repertório de células T reguladoras no timo ou se ele influencia diretamente o compartimento dessas células na periferia. Todavia, devido ao fato de que *Aire* controla a PGE de TRAs nas mTECs, acredita-se na idéia de que esses eventos poderiam também promover o desvio clonal de tímócitos para a geração de células T reguladoras<sup>[60]</sup>.

A exposição de antígenos-próprios regulados pela expressão de *Aire* durante o período fetal é essencial e suficiente para prevenir o aparecimento da autoimunidade a multiórgãos, comumente encontrada em animais deficientes desse gene. Qualquer antígeno ao qual o sistema imune é exposto durante o período fetal, ou nos estágios neonatais, é reconhecido como próprio, ocorrendo tolerância imunológica duradoura. Assim, acredita-se que linfócitos imaturos sejam grandemente sensíveis à indução de tolerância<sup>[133]</sup>.

Em nosso trabalho, observamos a manutenção da expressão de *Aire* em timos de animais recém-nascidos e adultos. Entretanto, essa expressão ocorreu em níveis bem menores quando comparados aos estágios iniciais de desenvolvimento do timo (E16.5 e E17.5), porém, foram semelhantes aos níveis de expressão observados nos estágios finais de desenvolvimento fetal desse órgão (E19.5 e E20.5). Esse achado corrobora os estudos que apontam para a diminuição nos níveis de *Aire* em tecidos tímicos adultos [117, 133]. Aparentemente, a expressão desse gene é dispensável no animal adulto, já que, teoricamente, os conjuntos de células T tolerizadas, durante o período fetal, podem diminuir as consequências deletérias dos clones de células T autorreativos que possam surgir na periferia no adulto [117, 133]

Conhecidamente, sabe-se que o gene *Aire* tem a capacidade de induzir a expressão de moléculas envolvidas na regulação das respostas imunes, como PD-1 e PD-1L [117]. Baseados nessa evidência, acreditamos que genes não-clássicos do MHC, como o *H2-T23* e *H2-Q10* poderiam estar sob controle transcricional do *Aire*. Levantamos essa possibilidade, baseados na observação dos perfis de expressão desses genes durante os estágios iniciais do desenvolvimento fetal.

O início da expressão de *Aire*, em timos fetais (E16.5) está correlacionado com o aumento nos níveis de expressão de *H2-T23*, *H2-Q7* e *H2-Q10* no mesmo período, e também, nos períodos subsequentes (de E17.5 a E20.5). Esse achado é bastante relevante, pois nos leva a pensar na possibilidade de genes de classe Ib do MHC estarem sendo regulados positivamente sob a ação do gene *Aire* durante os processos de PGE, garantindo assim, manutenção da tolerância aos antígenos próprios no timo durante o período fetal, como também na periferia ao longo do desenvolvimento do animal.

No timo, os genes regulados pelo *Aire* mostram claras evidências de agrupamento genômico, sugerindo que mecanismos epigenéticos estejam agindo em suas regulações transcricionais. Além disso, fatores como a especificidade tecidual, a suprarquitectura da cromatina, combinações de fatores de transcrição, ou ainda, microRNAs, podem modular genes susceptíveis à ação do *Aire* [135].

Sugere-se que o *Aire* após entrar no núcleo, preferencialmente, se localizaria em regiões de cromatina transcricionalmente silenciada e, nessas regiões, o domínio PHD-1 dessa molécula se ligaria especificamente a resíduos de lisina 4 não-metiladas em histonas

H3. Aire deve possuir a capacidade de ativar genes que possuem essa marca, H3K4me0, em suas regiões promotoras. Esses genes são usualmente silenciados ou expressos em baixos níveis. A baixa expressão e a presença da marca H3K4me0 pode ser característica de ativação de genes dependentes de Aire fora dos tecidos onde eles são normalmente expressos, como nas mTECs<sup>[119, 120]</sup>.

Conhecidamente em humanos, a expressão do gene *HLA-G* é regulada em nível epigenético, devido à presença de ilhas de metilação de motivos CpG dentro da região regulatória 5' proximal na posição -450 e -725 *upstream* ao códon de iniciação do gene do *HLA-G*<sup>[136, 137]</sup>. Além disso, a acetilação das histonas H3 e H4 nas regiões promotoras do gene *HLA-G* está relacionada com o aumento de sua expressão em células derivadas de câncer gástrico<sup>[136]</sup>.

Essas evidências nos levam a especular acerca da possibilidade de que, tanto o HLA-G quanto as outras moléculas não-clássicas do MHC humano e murino, possam ser passíveis de regulação pelo gene *Aire*. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados nessa área para verificar a possibilidade de ocorrência desse fenômeno.

A expressão do Aire é geralmente utilizada para definir o estágio de diferenciação das mTECs e a perda de sua função altera a arquitetura tímica e o amadurecimento dessas células. Além disso, ausência de Aire funcional promove a expressão reduzida do conjunto de TRAs nessas células, implicando em seleção negativa defeituosa, permitindo o escape de clones de células T autorreativas<sup>[117]</sup>.

Algumas teorias procuram explicar como o gene *Aire* influencia a diferenciação das mTECs e a capacidade dessas células em realizar a PGE. O primeiro modelo, o da diferenciação terminal, propõe que as diferentes subpopulações de mTECs, ocasionalmente, adquirem a capacidade de realizar PGE e se tornam mais diferenciadas e promíscuas. Nesse modelo, as unidades transcricionais da PGE se tornam totalmente ativas quando o *Aire* começa a ser expresso nas mTECs mais diferenciadas<sup>[138]</sup>. O outro modelo, o de desenvolvimento, considera que a PGE é um reflexo da multipotência de mTECs pré-maduras antes de se comprometerem com algum tipo celular. Nesse modelo, a expressão de vários conjuntos de genes de TRAs é regulada por programas conservados que são ativos em mTECs em desenvolvimento, controladas tanto por células Aire<sup>-</sup> ou Aire<sup>+</sup>. Esse modelo

considera que o *Aire* atua nos estágios iniciais de diferenciação das mTECs, entretanto, ele foi provado não ser válido, visto que evidências recentes, demonstraram que as mTECs maduras  $Aire^+CD80^{hi}$  ou  $Aire^+MHC-II^{hi}$  se desenvolvem a partir de mTECs imaturas  $Aire^-CD80^{lo}$  ou  $Aire^-MHC-II^{lo}$ . Em adição, as mTECs são pós-mitóticas e  $p63^-$  (marcador dos estágios iniciais de diferenciação epitelial) <sup>[138]</sup>, corroborando evidências de que o modelo de diferenciação terminal seja mais adequado para explicar a ação do gene *Aire*.

De acordo com a cinética de expressão de *Aire* observada em nosso trabalho, acreditamos na ocorrência do modelo de diferenciação terminal das mTECs, já que, observamos a expressão do gene por volta do dia E16.5 em animais C57BL/6 e dia E18.5 dia em animais BALB/c. Em ambas as linhagens, nesses períodos, a arquitetura tímica já está desenvolvida e já são abundantemente encontradas cTECs e mTECs nos compartimentos tímicos <sup>[129, 132]</sup>. Além disso, a ocorrência dos processos de recombinação V(D)J dos timócitos e início da PGE nesses períodos (E16.5 a E18.5) é indicativo de que o surgimento de mTECs embrionárias expressando *Aire* seja anterior ao aparecimento de timócitos maduros  $CD4^+TCR^{hi}/CD8^+TCR^{hi}$ , e ainda, anterior aos processos de seleção positiva e negativa, correlacionando-se com o aumento na proporção de células indutoras de tecido linfóide (LTis) <sup>[131]</sup>.

6.2. Perfis de expressão gênica de *H2-Q7(Qa2)*, *H2-Q10(Qa10)*, *H2-T23(Qa1)* e *Aire* em órgãos linfóides periféricos.

#### -Baço

Os órgãos linfóides periféricos ou secundários são tecidos anatomicamente distintos que eficientemente capturam e concentram antígenos estranhos para iniciar os eventos das respostas imunes adaptativas <sup>[121]</sup>. Esses órgãos linfóides especializados incluem o baço, os linfonodos e os tecidos linfóides associados às mucosas, como as placas de Peyer no intestino, as tonsilas, o tecido linfóide associado à mucosa nasal e o tecido linfóide associado à mucosa brônquica <sup>[140]</sup>.

Em camundongos, o desenvolvimento do baço e também dos linfonodos consiste de eventos altamente ordenados que se iniciam durante a embriogênese e continuam ao longo das 3 semanas após o nascimento do animal <sup>[140]</sup>.



O evento inicial no desenvolvimento dos órgãos linfóides periféricos é a formação do sistema linfático que se inicia por volta do E10.5, logo após o surgimento dos sacos linfóides a partir de vasos sanguíneos mais largos. Após a formação dos sacos linfóides, os tecidos conectivos invadem essa estrutura formando as estruturas precursoras dos linfonodos. A rede linfática completa encontra-se totalmente desenvolvida em animais com E15.5 dias. Durante a embriogênese e entre os dois primeiros dias após o nascimento do animal, as células endoteliais altas dos linfonodos passam a expressar moléculas de adesão o que permite a colonização dos linfonodos pelas células LTis<sup>[141]</sup>.

Em nosso estudo, observamos que no baço, o perfil de expressão do *H2-Q7(Qa2)* e do *H2-T23(Qa1)* foram similares, caracterizados pelo aumento gradativo dos níveis de mRNA com a idade do animal. Para o gene *H2-Q7*, observamos que esse padrão foi o mesmo observado no timo. Assim, a expressão de *H2-Q7* no baço de animais C57BL/6 foi cerca de 3 vezes mais elevada do que a observada em animais BALB/c. Esse resultado era esperado, visto que, tem sido relatado que animais BALB/c expressam menores níveis de Qa-2<sup>[61]</sup>.

De maneira geral, *H2-Q7* foi o gene mais expresso no baço de animais com idades superiores a 10 dias e, após o timo, esse órgão foi o que mais expressou *H2-Q7*. Esses resultados apóiam dados na literatura que relatam a ocorrência de expressão de Qa-2 no baço e afirmam que essa expressão ocorre em níveis suficientes para a realização de *priming* de células TCD8<sup>+</sup> por células esplênicas<sup>[73]</sup>.

Para o gene *H2-T23*, observamos que no baço a expressão do mRNA foi discretamente mais elevada em comparação com a observada no timo em idades equivalentes. Acreditamos que esse padrão de expressão no baço possa estar relacionado a estado de maior ativação das células T nesse órgão, visto que a expressão de Qa-1, preferencialmente, ocorre em células imunocompetentes ativadas<sup>[96,98]</sup>. Além disso, a expressão de *H2-T23* por órgãos linfóides periféricos, apóia evidências que mostram o envolvimento de Qa-1 na indução de células T CD8<sup>+</sup> regulatórias e na manutenção dos mecanismos de tolerância periférica<sup>[94,97,99]</sup>.

Em nosso estudo, não encontramos níveis significativos de *H2-Q10* em baços de animais C57BL/6 e BALB.

Em relação ao gene *Aire*, detectamos expressão do mRNA no baço de animais C57BL/6 com 15 e 60 dias de idade. A expressão desse gene no baço de animais adultos (60

dias) ocorreu em níveis semelhantes aos observados no timo no mesmo período. A detecção da expressão de *Aire* por células do baço é bastante interessante, visto que, nos últimos anos tem se notado o aumento no número de trabalhos que procuram identificar a expressão de *Aire* e a ocorrência da PGE por outros tecidos que não o timo [60, 117, 131].

A relevância e a funcionalidade da expressão de *Aire* em órgãos linfóides periféricos ainda é bastante controversa. Recentemente, foi visto que, células do estroma do linfonodo, do baço e das placas de Peyer (intestino) expressam níveis diminuídos de *Aire*. A expressão de *Aire* por esses órgãos ocorre em determinadas subpopulações celulares denominadas de eTACs (*extrathymic autoimmune regulator-expressing cells* - células extratímicas aire-positivas). As eTACs são células estromais localizadas na interface entre as zonas de células B e células T e expressam receptores característicos de células apresentadoras de antígenos, entretanto, elas diferem das mTECs pela ausência de alguns marcadores [60, 117]. Assim como as mTECs, as eTACs realizam os processos de expressão gênica promíscua e são capazes de mediar a deleção de células T autorreativas. Porém, o número de genes controlados pelo *Aire* nessas células é cerca de dez vezes menor em comparação ao número controlado pelas mTECs no timo. Além disso, foi demonstrado que ocorre pouca sobreposição entre os conjuntos de genes induzidos pelo *Aire* no timo e os observados nos órgãos linfóides periféricos. A diferença na composição dos genes induzidos pelo *Aire* nesses dois órgãos sugere um papel complementar dos mecanismos da tolerância periférica à tolerância que é desenvolvida no timo [60, 117].

#### - Fígado

O fígado é o maior órgão presente nos animais adultos e é responsável por diversas funções como metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos, secreção da bile, e ainda, promove a desintoxicação de xenobióticos [142]. A sua estrutura anatômica e a sua vasculatura fazem desse órgão um alvo importante para a ocorrência de importantes eventos imunológicos [142].

Diversas evidências suportam idéia de que o fígado atua como um órgão linfóide secundário, atuando predominantemente como órgão de imunidade inata, mas também, agindo como um local de ativação primária de células T e como barreira física responsável

pela filtração de antígenos, potencialmente perigosos, que podem alcançar o organismo através do trato gastrointestinal pelo sistema porta-hepático <sup>[143]</sup>.

Os sinusóides hepáticos e a rede reticuloendotelial contêm diversas populações de células imunologicamente importantes incluindo células NK, células de *Kupffer* (macrófagos hepáticos), células dendríticas, células NK-T, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, Linfócitos T $\gamma\delta$ , linfócitos T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> (DN), células T regulatórias CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, células estreladas e células dos sinusóides endoteliais hepáticos.

Estudos recentes têm relatado que o fígado é um órgão “tolerizado”, local onde ocorrem diversos mecanismos ativos de modulação das respostas imunes e devido ao seu tamanho e localização, esse órgão seria capaz de impor eventos de tolerância imunológica sistêmica <sup>[142, 143, 144]</sup>.

Nossos resultados mostraram que tanto no período fetal, quanto na fase adulta, o fígado foi responsável pela elevada expressão de genes de moléculas não-clássicas do MHC, principalmente do gene que codifica a molécula Qa10.

Durante o período fetal do fígado, observamos que os níveis de mRNA de *H2-Q7*(Qa2), *H2-T23*(Qa1) e *H2-Q10*(Qa10) foram diminuídos, em comparação com as idades pós-natais. Apesar disso, mostramos que a expressão desses transcritos já pode ser detectada durante o período embrionário em animais com E13.5 dias. Acreditamos que a expressão desses genes nesses períodos iniciais do desenvolvimento possa estar envolvida com a manutenção do estado “imunossuprimido” do fígado desde a fase embrionária até a fase adulta do animal, e ainda, possa estar envolvida nos processos de crescimento e desenvolvimento normal desse órgão, visto que os períodos embrionários e perinatais são críticos para esses processos <sup>[141, 144]</sup>.

Durante a embriogênese, o fígado fetal atua como importante órgão hematopoético, dando origem a diversos tipos celulares como os progenitores das células T e B, células NK, células dendríticas e monócitos <sup>[141, 144]</sup>. Conhecidamente, as células-tronco mesênquimais do fígado fetal expressam HLA-G <sup>[32]</sup> e, de forma semelhante, tem sido relatado que células-tronco hematopoéticas expressam a molécula Qa-2 <sup>[61]</sup>. Com base nessas evidências, acreditamos que a elevada expressão de transcritos para *H2-Q7*, *H2-T23* e *H2-Q10* durante o período fetal, possa estar sendo desempenhada por células-tronco

presentes nesse órgão, ou ainda por células da linhagem linfóide geradas no fígado durante o período embrionário.

No fígado, observamos que os níveis de RNAm de *H2-Q7* e de *H2-T23*, semelhante ao observado no timo, baço e intestino, obedeceram a um padrão de aumento de acordo com a idade do animal. Acreditamos que esse padrão possa estar relacionado com a montagem das respostas imunes e, como consequência, maior ativação celular frente aos diferentes estímulos que esses animais possam entrar em contato ao longo do seu desenvolvimento.

Tem sido demonstrado que as células hepáticas parenquimatosas expressam níveis elevados de Qa-2 <sup>[73]</sup>. Adicionalmente, o fígado possui uma população abundante de linfócitos T com TCR $\gamma\delta$  e células T DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) que estão envolvidas na regulação das respostas imunes nesse órgão, e possivelmente, na melhor aceitação a transplantes hepáticos <sup>[142]</sup>.

Sabendo que linfócitos T $\gamma\delta$  no timo, durante o período fetal, podem ser educados no contexto das moléculas Qa-2 e na periferia, no fígado, podem reconhecer antígenos apresentados no contexto dessa molécula <sup>[61, 73]</sup>, acreditamos na possibilidade de envolvimento de Qa-2 na regulação das respostas imunes desempenhadas por essas subpopulações de linfócitos no fígado durante a fase adulta.

Os leucócitos e a maioria dos tipos celulares residentes no fígado possuem funções imunossupressoras e são, preferencialmente, tolerogênicos. Os mecanismos de tolerância nesse órgão envolvem eventos de apoptose por negligência, devido à ligação de células T às APCs com baixos níveis de co-estimulação, e envolvem também, eventos ativos de imunossupressão realizados por células imunoregulatórias, sendo esses últimos, os principais mecanismos que garantem a manutenção do fígado como órgão tolerogênico <sup>[142, 143]</sup>.

Esse estado constante de tolerância, observado nas subpopulações celulares hepáticas, possivelmente, é uma das razões que contribui para os altos índices de aceitação de transplantes hepáticos, mas também abre uma janela de vulnerabilidade para patógenos mais adaptados, como os vírus da hepatite e o *Plasmodium sp.*, infectarem e estabelecerem as infecções crônicas observadas neste órgão <sup>[143]</sup>.

As células de *Kupffer*, as células dos sinusóides endoteliais e as células estreladas hepáticas possuem a capacidade de apresentar antígenos às células T e de promover a inibição dessas células pela produção de IL-10, e ainda, pela expressão de moléculas tolerogênicas, como PD-1/PD-1L<sup>[142, 143]</sup>.

A expressão elevada de *H2-Q10*, *H2-Q7* e *H2-T23* no fígado, observada em nosso trabalho, e as evidências de que as células hepáticas podem expressar moléculas relacionadas com modulação do sistema imune, é mais um forte indício que nos leva a especular acerca do envolvimento de moléculas não-clássicas do MHC de classe Ib na manutenção da homeostase imunológica desse órgão.

No fígado, a população de células NK compõe cerca de 50% do total de linfócitos isolados e, nesse órgão, expressam os receptores CD94/NKG2A, NKG2B e NKG2C<sup>[142, 143]</sup>. Como os principais ligantes para esses receptores são moléculas não-clássicas do MHC de classe I, como Qa-1, acreditamos que a expressão de *H2-T23* possa estar contribuindo com inibição das ações efectoras dessas células pela interação com o Qa-1.

Adicionalmente, as células dos sinusóides endoteliais do fígado são capazes de promover o desvio do sistema imune para o perfil de células T regulatórias, tanto TCD4<sup>+</sup> quanto TCD8<sup>+</sup><sup>[142, 143]</sup>. No fígado, podem ser isoladas diversas subpopulações de células TCD8<sup>+</sup> regulatórias, entre elas, aquelas que possivelmente possam ser restritas à molécula Qa-1<sup>[94, 96]</sup>. Dessa forma, acreditamos que a elevada expressão de *H2-T23* observada em fígados de animais com 15, 45 e 60 dias, além de contribuir para a inibição da ação de células NK, poderia ainda, estar relacionada com o surgimento do *pool* de células T CD8<sup>+</sup> regulatórias restritas ao Qa-1 nesse órgão.

Em humanos, alguns subtipos de células T CD8<sup>+</sup> têm sido identificados e denominados como células TCD8<sup>+</sup> naturais, possuindo fenótipo CD8<sup>+</sup>HLA-G2<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup><sup>[143]</sup>. Aparentemente, a expressão de HLA-G por essas células possui envolvimento com os processos de imunossupressão observados no fígado<sup>[143]</sup>.

Entre as linhagens, de forma geral, animais C57BL/6 expressaram maiores níveis de *H2-Q7* e animais BALB/c, maiores níveis de *H2-T23*. Como sugerido anteriormente para os outros órgãos, como timo e baço, acreditamos que essas diferenças de expressão entre as linhagens possam contribuir para os seus distintos padrões de susceptibilidade e resistência a infecções por diversos patógenos intracelulares<sup>[149, 150, 151, 152]</sup>.

Nossos resultados mostraram que o gene *H2-Q10* foi o mais expresso em todos os períodos analisados no fígado, tanto em animais C57BL/6, quanto em animais BALB/c, com tendência a elevações gradativas nos níveis de RNAm de acordo com a idade do animal. Os níveis de *H2-Q10*, quando comparados entre os diferentes órgãos, foram detectados quase que exclusivamente no fígado (e intestino). Esses resultados estão de acordo com dados na literatura que afirmam que Qa10 é uma molécula fígado-específica, expressa em altos níveis pelas células parenquimatosas hepáticas (hepatócitos) e secretada no soro ao invés de estarem associadas à membrana [92, 93, 94]. Além disso, tem sido relatado que hepatócitos que expressam Qa10, aparentemente, são livres de processos autoimunes e mostram poucas evidências de lesão celular [92].

Animais transgênicos para o Qa10 são funcionalmente tolerantes a antígenos presentes exclusivamente em células parenquimatosas do fígado. Nesses animais, observou-se a ocorrência da inativação de células T antígeno-específicas por mecanismos envolvendo, possivelmente, a molécula Qa10 [92]. Especula-se a possibilidade dos mecanismos de tolerância periférica que ocorrem nesse órgão envolvam a deleção ou a inativação de células que reconheçam antígenos específicos no contexto de moléculas de MHC, como o Qa10 [92].

Tem sido demonstrado que devido as suas características, o fígado pode impor eventos de tolerância imunológica sistêmica, influenciando as respostas imunes em outros locais do corpo [143]. Conhecidamente, os transplantes de fígado são os que possuem os maiores índices de aceitação em comparação aos outros órgãos. Em casos de co-transplantes renal ou cardíaco associado ao fígado, a aceitação desses órgãos é mais bem sucedida devido, possivelmente, à tolerância sistêmica imposta pelo fígado [142, 143].

Os mecanismos que o fígado utiliza para impor um estado imunossupressor sistêmico envolvem a captura de células T CD8<sup>+</sup> ativadas circulantes, através da expressão de moléculas de adesão no endotélio dos vasos hepáticos, o desvio das respostas imunes para um padrão de células T regulatórias e a produção de citocinas, como a IL-10, pelas células de *Kupffer* [143].

Embasados nesses mecanismos, acreditamos que a elevada produção de Qa10 solúvel pelo fígado, poderia ser um dos mecanismos utilizados por esse órgão para modular as respostas imunes em diferentes locais do corpo. Assim, a expressão de Qa10 seria um mecanismo adicional pelo qual o fígado impor a tolerância imunológica sistêmica, visto

que, a molécula Qa10, por ser molécula exclusivamente solúvel, poderia teoricamente acessar, através da circulação, diversos órgãos, inclusive sítios-alvo de manifestações autoimunes ou aloenxertos<sup>[61]</sup>.

### -Intestino

A mucosa intestinal é provida por um sistema imune altamente especializado e distinto em muitos aspectos de outros compartimentos do sistema imunológico. As células imunocompetentes da mucosa intestinal são expostas constantemente a grande variedade de antígenos derivados dos alimentos, de bactérias residentes e de microrganismos invasores<sup>[145, 146]</sup>.

Devido às suas funções, o intestino precisa ser órgão delimitado por barreira que permita a absorção de nutrientes, garanta a manutenção constante da tolerância aos alimentos e aos produtos da flora comensal e, ainda, permita a montagem de respostas imunológicas na defesa contra antígenos potencialmente patogênicos<sup>[145]</sup>.

O sistema imune da mucosa intestinal compreende alguns compartimentos como as placas de Peyer, os folículos linfóides da mucosa colônica, os linfócitos presentes na lâmina própria e os linfócitos intra-epiteliais. As placas de Peyer se localizam nas porções antimesentéricas da mucosa e são compostas por múltiplos folículos linfóides associados ao epitélio, centros germinais e regiões interfoliculares conectadas a vênulas de endotélio alto e os vasos linfáticos eferentes<sup>[145]</sup>.

Na lâmina própria, a maioria dos linfócitos T são CD4<sup>+</sup> e TCR  $\alpha\beta$ (60-70%). O restante (30-40 %) é composto por linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Algumas subpopulações mais restritas de células T se desenvolvem independentemente das placas de Peyer, sendo integradas à camada epitelial. Essas células recebem o nome de linfócitos T intra-epiteliais (iIELs) e são predominantemente CD8<sup>+</sup>. Em humanos, 5 a 30 % das iIELs do intestino delgado possuem TCR $\gamma\delta$  e são ou CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> DN. Na lâmina própria, é encontrada alta frequência de células T ativadas e de memória que permitem a rápida montagem de respostas imunes contra os patógenos<sup>[145, 146]</sup>.

Em nosso estudo, foi observado que, assim como no fígado, a expressão de *H2-Q7(Qa2)* e *H2-T23(Qa1)* aumentou gradativamente de acordo com a idade do animal, sendo que ambos os genes foram os mais expressos em intestinos de animais adultos.

Dados na literatura têm demonstrado a ocorrência de linfócitos intra-epiteliais educados no contexto das moléculas Qa-2 <sup>[73, 87]</sup>. No intestino, Qa-2 poderia estar relacionado com a seleção extra-tímica de linfócitos intra-epiteliais TCD8 $\alpha$  por meio da apresentação de determinados antígenos para essas células <sup>[73, 87]</sup>. Adicionalmente, subtipos de linfócitos intra-epiteliais com TCR $\gamma\delta$ , além de estarem envolvidos na manutenção da integridade da barreira epitelial, estão envolvidos também na regulação das respostas imunes intestinais por mecanismos de imunossupressão <sup>[145]</sup>.

Células epiteliais do intestino também podem expressar Qa-2, entretanto, essa expressão é bem menor do que a observada nos iIELs, e ainda, menor do que os níveis de moléculas clássicas como H2-D e K <sup>[73]</sup>. Além disso, tem sido relatado que animais deficientes de Qa-2 são susceptíveis a infecções causadas por *Taenia crassiceps* e que os níveis dessa molécula se correlacionam com a resistência a infecções e com os níveis celulares de iIELs CD8 $\alpha$  TCR $\alpha\beta$  <sup>[73]</sup>.

A descoberta de que subpopulações do intestino expressam Qa-2 é de potencial interesse, visto que evidências recentes mostram que sua expressão está implicada na seleção e manutenção de iIELs CD8 $\alpha$ /TCR $\alpha\beta$  de mucosa e, por conseqüência, na regulação das respostas imunes <sup>[73]</sup>. Adicionalmente, como grande parte dos iIELs expressam predominantemente CD8<sup>+</sup> <sup>[145]</sup> e estão envolvidos com a manutenção da homeostase intestinal, acreditamos que a expressão de Qa-2 nesse órgão seja essencial para as atividades efetoras dessas células através da apresentação de determinados antígenos específicos via Qa-2.

Em nosso estudo, foi observado que o gene *H2-T23* foi o mais expresso no intestino de animais adultos, sendo o intestino, logo após o fígado, o órgão que mais expressou esse transcrito, em ambas as linhagens estudadas. Acreditamos que os elevados níveis de *H2-T23* identificados possam estar correlacionados com o envolvimento da molécula Qa-1 na modulação das respostas imunes para a manutenção da homeostase imunológica e indução da tolerância oral intestinal.

A tolerância oral é definida como a indução de estado de não-responsividade a antígenos administrados oralmente, mesmo após o desafio antigênico subsequente. Conhecidamente, a administração oral de antígenos protéicos solúveis induz estado de não-responsividade imunológica sistêmica específica para as proteínas dos alimentos <sup>[145, 146]</sup>.



Em situações fisiológicas, os antígenos encontrados na mucosa intestinal induzem tolerância nas células da lâmina própria e nos linfócitos intra-epiteliais, devido à apresentação alterada de peptídeos que levam à anergia induzida pelo antígeno, ou ainda, à deleção dos clones de células T específicos [145]. De maneira geral, os principais mecanismos utilizados na indução da tolerância oral são a deleção clonal, a anergia e a indução de células supressoras que inibem ativamente clones de linfócitos T [145, 146].

Baseados nessas evidências, levantamos a possibilidade de que, no intestino, a elevada expressão de *H2-T23* esteja relacionada com os mecanismos desempenhados pela molécula Qa-1 na supressão das respostas de células NK e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> por meio da interação com receptores de inibição, na apresentação de determinados antígenos para subtipos de linfócitos T $\gamma\delta$  [69] e para a manutenção e geração de células T CD8<sup>+</sup> regulatórias restritas ao reconhecimento de Qa-1, contribuindo assim, diretamente para o estabelecimento do estado de tolerância oral no intestino.

Dados na literatura têm relatado que as células T reguladoras são abundantemente encontradas na lâmina própria do intestino, podendo ser geradas nesses locais ou ainda podendo migrar para esses sítios. As células T reguladoras exibem alto potencial migratório específico para determinados tecidos, principalmente para o intestino, por possuírem receptores de endereçamento (*homing*) para esse órgão [146].

Durante o desenvolvimento fetal do intestino, não observamos diferenças significantes na expressão de *H2-Q7* e *H2-T23*. Entretanto, observamos que o gene *H2-Q10* foi o mais expresso nesse período e no período perinatal (entre E14.5 e 5 dias). Esses resultados são interessantes, já que fornecem evidências de que outros órgãos, além do fígado, possam expressar Qa10 e induzir eventos de tolerância sistêmica.

Além disso, podemos observar que em intestinos de embriões, por volta do dia 13.5, já podem ser detectados níveis consideráveis de transcritos para essas moléculas não-clássicas do MHC, corroborando a idéia de que, desde o início da ontogenia, a expressão constitutiva dessas moléculas é importante na manutenção da homeostase imunológica intestinal.

Em nosso estudo, observamos níveis diminuídos de transcritos para o *Aire* no intestino em comparação aos outros genes analisados. Entretanto, esses níveis foram

detectados em intestinos de animais já durante o período fetal e aumentaram discretamente, durante o período perinatal, principalmente em animais BALB/c.

Análises do desenvolvimento fetal do intestino e dos linfonodos mesentéricos rudimentares (entre E16.5 e E18.5) de camundongos têm revelado a presença das LTis para a formação dessas estruturas. Essas células, são as mesmas LTis envolvidas intimamente na diferenciação das mTECs no timo<sup>[141]</sup>.

No intestino fetal, as placas de Peyer já são observadas em animais com E15.5 dias. Dentro dessas estruturas, por volta dos dias E16.5 e E17.5, ocorre o acúmulo de células hematopoéticas CD45, CD11c, MHC-II, CD4<sup>+</sup> (LTis) que são necessárias para a formação normal dos centros organizadores dessas estruturas<sup>[141]</sup>.

Os nossos resultados para o gene *Aire* no intestino, juntamente com as evidências acerca do papel das LTis na formação das placas de Peyer e na diferenciação das mTECs durante o período fetal<sup>[60, 141]</sup>, nos leva a pensar na possibilidade do envolvimento de *Aire* nos processos de seleção extra-tímica e na realização da indução de PGE no intestino. É importante notar que as eTACs presentes nas placas de Peyer expressam *Aire* e realizam processos de PGE. Em nosso estudo, demonstramos então, que *Aire* já pode ser detectado, em níveis diminuídos, em intestinos de fetos com E13.5 dias e se mantêm constantes em idades posteriores ao nascimento do animal.

### *6.3. Perfis de expressão gênica de H2-Q7(Qa2), H2-Q10(Qa10), H2-T23(Qa1) e Aire em sítios imunologicamente privilegiados.*

#### -Placenta

O termo imunoprivilégio é utilizado geralmente para descrever a proteção das estruturas vitais, como o cérebro, os testículos, a câmara anterior do olho e o útero gestacional, dos efeitos potencialmente nocivos das respostas imunes inflamatórias<sup>[146]</sup>. Essas estruturas, geralmente, possuem adaptações que atuam como barreiras físicas impedindo a entrada de células do sistema imune. Essas adaptações incluem a barreira hemato-encefálica no cérebro, a baixa temperatura nos testículos, a pouca vascularização da câmara anterior do olho, a presença de moléculas como Fas-FasL ou ainda a presença de

moléculas não-clássicas do MHC de classe I, como o HLA-G, nos tecidos embrionários e da placenta<sup>[146]</sup>.

A placenta compõe a interface materno-fetal promovendo grande número de funções essenciais para o desenvolvimento do feto e para a sua sobrevivência. A eficiência da placenta em realizar tais funções é dependente de vários fatores, incluindo a sua área de superfície, a sua vascularização e permeabilidade, a influência do útero e do cordão umbilical na transferência de substratos ao feto, e finalmente, a manutenção do privilégio imunológico protegendo o feto da ação de células NK e de linfócitos T maternos<sup>[144]</sup>.

Na placenta, nos estágios finais do desenvolvimento embrionário (E13.5 a 20.5), não observamos diferenças nos níveis de expressão dos genes *H2-Q7*, *H2-Q10* e *H2-T23*. Para esses genes, observamos diminuição progressiva dos níveis de mRNA com o avanço da gestação, tanto em animais C57BL/6 quanto BALB/c.

Em nosso estudo, não obtivemos placentas em estágios iniciais da gestação. Acreditamos que será necessário analisar a expressão desses genes ao longo de toda a gestação para podermos definir a importância biológica que eles possuem ao longo de todo o desenvolvimento gestacional. Todavia, os padrões de expressão observados nos estágios gestacionais mais tardios, analisados no presente estudo, nos levam a especular acerca da importância de Qa-1 e Qa-2, tanto no desenvolvimento do inicial do embrião, quanto na manutenção da integridade do feto nos estágios finais da gestação, visto que, evidências têm mostrado que a presença de Qa-2 na interface materno-fetal confere vantagem seletiva nesses períodos<sup>[85]</sup>.

Os perfis de expressão de *H2-Q7* e *H2-T23* observados em nosso trabalho estão de acordo com estudos em humanos que mostram que a molécula de HLA-G apresenta regulação temporal bem marcada durante a gravidez, havendo elevada expressão no início e diminuição da expressão no terceiro trimestre de gestação<sup>[147]</sup>.

Tanto para o *H2-Q7*, *H2-Q10* quanto para o *H2-T23*, os níveis de expressão do mRNA foram mais elevados em animais C57BL/6 em comparação aos animais BALB/c. Interessantemente, nossos resultados mostraram níveis mais elevados de *H2-T23* em comparação ao *H2-Q7* na placenta.

Os resultados observados para *H2-T23*, neste trabalho, são semelhantes a dados que mostram que na placenta humana ocorre a presença, tanto de HLA-G como de HLA-E,

em células do trofoblasto. Nesses locais, ambas as moléculas de classe Ib estão envolvidas na inibição da ação de células NK maternas<sup>[146]</sup>.

Os níveis de mRNA de *Aire* e de *H2-Q10* se mostraram bastante diminuídos na placenta. Entretanto, observamos em placentas derivadas de animais com E20.5 dias de gestação, discreto aumento nos níveis de mRNA de *Aire*, sugerindo que a placenta possa ser local de realização da PGE. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para validar essas evidências.

O fato de *H2-T23(Qa1)* ter sido mais expresso do que o gene *H2-Q7(Qa2)* foi algo surpreendente para nós, já que a placenta e os tecidos embrionários são descritos na literatura como sendo os principais sítios de expressão de Qa-2. Nesse contexto, os genes *H2-Q6/Q7/Q8/Q9* são denominados de *Ped gene* (gene da pré-implantação e desenvolvimento embrionário)<sup>[67, 71, 75, 77]</sup>.

A expressão de Qa-2 é essencial para o desenvolvimento normal dos embriões. Em animais da linhagem B6K1, que não expressam Qa-2, é observada a perda dos fetos por volta do E14.5 dia de desenvolvimento fetal. Demonstrando que a presença dessa molécula na interface materno-fetal confere vantagem seletiva nessa fase da gestação<sup>[85]</sup>.

Além disso, animais deficientes de Qa-2 mostram menor tamanho e peso ao nascer. Com 21 semanas de vida, esses animais possuem índices significativamente elevados de pressão arterial e são acometidos de síndrome metabólica caracterizada pelo aumento de determinados órgãos, como cérebro, fígado e pulmão<sup>[85]</sup>.

A importância de Qa-1 e Qa-2 na placenta é demonstrada a partir de estudos que mostram que as células T  $\gamma\delta$ , presentes em determinados sítios, como na decídua, são oligoclonais e restritos a antígenos apresentados por moléculas de classe Ib. Interessantemente, essas populações de células T  $\gamma\delta$  são selecionadas no timo durante o período fetal. O eventos de seleção de timócitos restritos a moléculas não-clássicas no timo fetal podem influenciar o repertório de células T que realizam respostas imunes na periferia e em tecidos, como nas células epiteliais uterinas<sup>[126]</sup>.

Acreditamos que estudos mais aprofundados acerca de como os eventos de seleção tímica contribuem para a geração de timócitos restritos as moléculas não-clássicas, como Qa-2 e HLA-G, poderiam fornecer informações sobre os mecanismos utilizados pelo sistema imune materno para se adaptar ao exerto semi-alogênico fetal<sup>[126]</sup>.

Acredita-se que a expressão de moléculas não-clássicas do MHC, como o HLA-G e Qa-2 no timo materno, e em células do trofoblasto fetal, poderia ter sido conservada e selecionada ao longo da evolução para a garantia de proteção do feto durante a gravidez [146].

#### -Cérebro

A expressão do mRNA de *H2-Q7(Qa2)*, *H2-Q10(Qa10)* e *H2-T23(Qa1)* foi detectada no cérebro, entretanto, em níveis bastante diminuídos. Não observamos diferenças significantes na expressão desses mRNA nos diferentes períodos analisados e também não foram observadas diferenças entre as duas linhagens estudadas. Esses resultados corroboram estudos que mostram que no cérebro, a expressão de moléculas de classe Ib do MHC, ocorre em níveis bastante diminuídos e por vezes até não detectáveis [61, 73].

Todavia, quando comparamos os níveis de expressão dos quatro genes juntos, observamos que os níveis de mRNA de *H2-Q7* foram discretamente mais elevados do que os outros genes. Recentemente, foi sugerido que a molécula Qa-2, quando expressa no cérebro, pode ter importante função no desenvolvimento e na plasticidade desse órgão [127].

De maneira semelhante, evidências têm demonstrado que a expressão induzida de HLA-G no cérebro, durante o curso de processos inflamatórios de doenças como a esclerose múltipla, desempenha importantes funções, como a inibição das respostas mediadas por células T citotóxicas e células NK e inibição da proliferação de células T [146].

No cérebro, nossos resultados sugerem que, caso as moléculas codificadas pelos genes avaliados nesse estudo, sejam expressas nesse órgão, essa expressão deve ocorrer em níveis bastante diminuídos, em situações especiais ou em sítios distintos do cérebro.

Interessantemente, no cérebro, observamos a presença de mRNA de *Aire* em todas as idades avaliadas e em níveis semelhantes aos observados no intestino, principalmente em animais BALB/c. Esse achado é relevante, e nos leva a especular sobre o efeito biológico da expressão de *Aire* em tecidos do sistema nervoso central.

Finalizando, mostramos que a expressão de genes não-clássicos do MHC murino ocorre em níveis elevados durante o desenvolvimento do timo, principalmente em timo de animais adultos. E que, de maneira geral, a expressão desses genes obedece a um padrão de

aumento gradativo de acordo com a idade do animal, como visto para o timo, e para órgãos periféricos como fígado, intestino e baço.

Consideramos importante estudo como este, já que é cada vez mais notório que a ocorrência da geração e da seleção de células T restritas às moléculas de classe Ib durante o desenvolvimento tímico podem ser um dos possíveis mecanismos pelos quais o sistema imune utiliza para garantir a manutenção da tolerância periférica em outros órgãos e tecidos do corpo.

Consideramos que ainda há muito estudo a ser realizado nessa área. Como perspectivas futuras, pretendemos analisar a expressão protéica de Qa-1, Qa-2, Qa10 e Aire nos órgãos de diferentes idades que obtivemos ao longo deste trabalho, e que se encontram estocados a  $-80^{\circ}$  C. Pretendemos ainda, realizar a verificação de quais subpopulações tímicas expressam Qa-2, Qa-1 e Qa10 através da separação do estroma tímico e dos timócitos; realizar análises *in silico* de possíveis sítios de ligação para o Aire nas regiões promotoras de *H2-Q7*, *H2-Q10* e *H2-T23*, a fim de verificar se esses genes são passíveis de regulação pelo *Aire*; verificar a ocorrência de diferentes subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> restritas ao Qa-1 entre animais C57BL/6 e BALB/c, a fim de se verificar uma das possíveis razões das diferenças na susceptibilidade e resistência desses animais aos mesmos patógenos; e pretendemos ainda, realizar a análise dos níveis de Qa-1, Qa-2, Qa10 e Aire, e seus respectivos transcritos, em animais acometidos de manifestações autoimunes.

O aprofundamento nos estudos envolvendo essas moléculas, em modelos animais pode contribuir de forma significativa aos conhecimentos atuais acerca do HLA-G e HLA-E, em humanos. Esses estudos constituem-se, dessa forma, uma prévia fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, como por exemplo, a produção de moléculas não-clássicas do MHC recombinantes associadas às terapias de imunossupressão. Esse tipo de abordagem poderia contribuir de forma direta para a melhoria da qualidade de vida da população e oferecer novas perspectivas acerca dos mecanismos utilizados pelo sistema imunológico para regular as respostas imunes através da indução de eventos de tolerância imunológica.

# Sumário de Resultados e Conclusões

## 7. SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÕES

**7.1.** O gene *H2-Q7* é expresso durante todo o desenvolvimento fetal do timo, particularmente entre por volta do dia E20.5. Entretanto os níveis mais elevados desse transcrito ocorrem em timos de animais adultos, sendo esse órgão a maior fonte de *H2-Q7* observada. O perfil de expressão de *H2-Q7* é semelhante entre o timo e os órgãos linfóides periféricos e é caracterizado por aumentos gradativos dos níveis de RNAm de acordo com a idade do animal. Na placenta, é observada a diminuição dos níveis de *H2-Q7* nos estágios finais da gestação e, de forma geral, os níveis de *H2-Q7* são inferiores aos de *H2-T23*. O cérebro, aparentemente, não expressa níveis consideráveis desse transcrito. De maneira geral, em todos os órgãos analisados, animais C57BL/6 expressam níveis consideravelmente mais elevados de *H2-Q7* do que animais BALB/c.

**7.2.** No timo o perfil de expressão de *H2-T23* mostra pouca variação entre os períodos fetais e pós-natais, com discretos aumentos nos níveis de RNAm em animais adultos. *H2-T23* é altamente expresso pelo fígado e intestino durante todo o desenvolvimento, com aumentos gradativos ao longo da ontogenia. No baço são observados aumentos importantes na expressão de *H2-T23* de acordo com o avanço da idade. Baço e placenta expressam níveis semelhantes desse transcrito, sendo que na placenta é observada a diminuição dos níveis de *H2-T23* com o avanço da gestação. Aparentemente o cérebro expressa níveis diminuídos desse transcrito. De maneira geral, para todos os órgãos e na maioria das idades, animais BALB/c expressam níveis mais elevados de RNAm para *H2-T23*. Nesses animais, os maiores níveis de *H2-T23* são observados no intestino, enquanto que em animais C57BL/6, os níveis mais elevados ocorrem no fígado.

**7.3.** O gene *H2-Q10* é específico do fígado e altamente expresso durante todo o desenvolvimento hepático. Os níveis mais elevados de *H2-Q10* são observados por tecidos hepáticos adultos. No fígado, o perfil de expressão de *H2-Q10* é semelhante ao dos outros genes de classe Ib e mostra aumentos gradativos a idade do animal. No timo e intestino, *H2-Q10* é mais expresso durante o período fetal, entretanto em níveis consideravelmente diminuídos em relação ao fígado. A expressão de *H2-Q10* não é observada no baço, na



placenta e no cérebro. Animais das linhagens C57BL/6 e BALB/c expressam *H2-Q10*, entretanto, os níveis desse transcrito entre as duas linhagens variam de acordo com o órgão e idade analisados e, de maneira geral, não mostram diferenças significativas.

**7.4.** O gene *Aire* é abundantemente expresso durante o desenvolvimento fetal do timo. Em animais C57BL/6, *Aire* começa a ser significativamente expresso por volta do E16.5 dia de desenvolvimento. Em animais BALB/c, aumentos na expressão de *Aire* são observados por volta do dia E18.5. A expressão do mRNA de *Aire* em ambas as linhagens é mantida em níveis bastante diminuídos ao longo do período perinatal do timo e em timos de animais adultos. A expressão extra-tímica de *Aire* pode ser observada em órgãos como baço, intestino, placenta e cérebro, entretanto, em comparação ao timo fetal, essa expressão ocorre em níveis consideravelmente diminuídos, tanto no período fetal quanto pós-natal. De maneira geral, em órgãos linfóides, os maiores níveis de mRNA de *Aire* são observados em animais da linhagem BALB/c em comparação aos animais C57BL/6.

Baseados nas hipóteses levantadas e nos objetivos propostos, concluimos que:

1. Genes não-clássicos do MHC de classe I começam a ser expressos cedo durante a ontogenia do timo e de órgãos linfóides periféricos, cujos níveis variam de acordo com o órgão estudado e a idade do animal;
2. Durante a ontogenia do timo, o gene *Aire* é pronunciadamente mais expresso no período fetal e detectado em níveis diminuídos na fase adulta e em órgãos linfóides periféricos, indicando que sua funcionalidade transcende ao período fetal.
3. Animais das linhagens C57BL/6 e BALB/c, ao longo do seu desenvolvimento, apresentam perfis de expressão gênica, em geral, semelhantes, porém, com níveis de transcritos diferentes, variando de acordo com a fase de desenvolvimento de cada órgão.

## Referências bibliográficas

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SNELL G.D. Methods for the study of histocompatibility genes. **J Genet**, (1948) 49, 87-108.
2. ABBAS A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.J. The Major Histocompatibility Complex. **Cellular and Molecular Immunology**, (2000) Schmitt, W. 63 - 78. W.B. Saunders Company: Philadelphia.
3. BREUNING M.H., VAN DEN BERG-LOONEN E.M., BERNINI L.F., BIJLSMA J.B., VAN LOGHEM E., MEERA KHAN P. & NIJENHUIS L.E. Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. **Hum Genet**, 1977; 37, 131-9.
4. VAN SOMEREN H., WESTERVELD A., HAGEMEIJER A., MEES J.R., MEERA KHAN P., ZAALBERG, O.B. Human antigen and enzyme markers in man-Chinese hamster somatic cell hybrids: evidence for synteny between the HL-A, PGM3, ME1, and IPO-B loci. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1974. 71, 962-5.
5. CAMPBELL R.D. & TROWSDALE J. Map of the human MHC. **Immunol Today**, 1993 14, 349-52.
6. EREN E., TRAVERS P. The structure of the major histocompatibility complex and its molecular interactions. **IHLA in Health and Disease**, 2000; Warrens, R.L.a.A. 23 - 34. Academic Press..
7. LANIER L.L. Natural killer cells: from no receptors to too many. **Immunity**, 1997 6,371-8.
8. LEIBSON P.J. MHC-recognizing receptors: they're not just for T cells anymore. **Immunity**, 1995 3, 5-8.
9. GERAGHTY D.E. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. **Curr Opin Immunol**, (1993) 5, 3-7.
10. SULLIVAN L.C.; HOARE H.L.; McCLUSKEY J.; ROSSJOHN J.; BROOKS A.G. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. **Trends in Immunology**, 2006.27 (9) .p.413-420.
11. KELLY A.P., MONACO, J.J., CHO, S.G. & TROWSDALE, J.. A new human HLA class II-related locus, DM. **Nature**, (1991)353, 571-3.
12. SLOAN V.S., CAMERON, P., PORTER, G., GAMMON, M., AMAYA, M., MELLINS, E. & ZALLER, D.M. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. **Nature**, (1995). 375, 802-6.
13. BAHRAM S., BRESNAHAN, M., GERAGHTY, D.E. & SPIES, T.. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, (1994) 91, 6259-63.
14. CAROSELLA ED, MOREAU P, LE MAOULT J, LE DISCORDE M, DAUSSET J, ROUAS-FREISS N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv Immunol** 2003;81:199-252.
15. CAROSELLA ED, MOREAU P, LEMAULT J, ROUAS-FREISS N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunol** 2008;29:125-32.
16. GERAGHTY D.E., KOLLER B.H., ORR, H.T. A human major histocompatibility complex A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1987. 84, 9145-9.
17. ELLIS S.A., PALMER M.S., MCMICHAEL A.J. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. **J Immunol**, (1990). 144, 731-5.
18. CASTELLI E.C, MENDES-JUNIOR C.T, DONADI E.A. HLA-G alleles and HLA-G 14bp polymorphisms in a Brazilian population **Tissue Antigens**, 2007(a). 70: 62-8.
19. CASTELLI E.C., MENDES-JUNIOR C.T., WIEZEL C.E., PERES N.T., SIMOES A.L., ROSSI, N.M., DONADI E.A. A novel HLA-G allele, HLA-G\* 010111, in Brazilian population. **Tissue Antigens**, 2007(b). 70: 349-50.

20. FUJII T., ISHITANI A., GERAGHTY D.E. A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. **J Immunol**, (1994) 153, 5516-24.
21. 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 U S A**, (1992) 89, 3947-51.
22. PAUL P., CABESTRE F.A., IBRAHIM E.C., LEFEBVRE S., KHALIL-DAHER I., VAZEUX G., QUILES R.M., BERMOND F., DAUSSET J. CAROSELLA E.D. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. **Hum Immunol**, (2000). 61, 1138-49.
23. LEMAULT J., LE DISCORDE M., ROUAS-FREISS N., MOREAU P., MENIER C., MCCLUSKEY J. CAROSELLA E.D.. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. **Tissue Antigens**, (2003).62, 273-84.
24. BAINBRIDGE D.R., ELLIS S.A. SARGENT I.L. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. **J Reprod Immunol**, (2000). 48, 17-26.
25. ELLIS S.A., SARGENT I.L., REDMAN C.W., MCMICHAEL A.J. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. **Immunology**. 1986, vol.59, p.595-60.
26. KING A., HIBY S.E., GARDNER L., JOSEPH S., BOWEN J.M., VERMA S., BURRWS T.D., LOKE Y.W. Recognition of trophoblasts HLA class I molecules by decidual NK cell receptors-a review. **Placenta**, 2000. 21 suppl A, s81-5.
27. LE DISCORDE M., MOREAU P., SABATIER P., LEGEAIS J.M., CAROSELLA E.D. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Hum Immunol**, 2003 vol.64,p.1039-44.
28. ISHITANI A., SAGESHIMA N., DOROFEEVA N., HATAKE K., MARQUARDT H., GERAGHTY D.E. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. **J Immunol**, vol.171, p.1376-1384, 2003.
29. CRISA L., MCMASTER M.T., ISHII J. F. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. **J Exp Med**. 1997, vol.186, p.289-298.
30. MENIER C., RABREAU M., CHALLIER J.C., LE DISCORDE M., CAROSELLA E.D., ROUAS-FREISS N. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**. Nov 15;104(10):3153-60,2004.
31. CIRULLI V., ZALATAN J., MCMASTER M., PRINSEN R., SALOMON D.R., RICORDI C., TORBETT B.E., MEDA P., CRISA L. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**. 2006; 55(5):1214-22.
32. GOTHERSTROM ., WEST A., LIDEN J., UZUNEL M., LAHESMAA R., LE BLANC K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. **Haematologica**, 2005. 90, Issue 8, 1017-1026.
33. ALLIS C.D., BERGER S.L., COTE J., DENT S., JENUWIEN T., KOUZARIDES T., PILLUS L., REINBERG D., SHI Y., SHIEKHATTAR R., SHILATIFARD A., WORKMAN J. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. **Cell** 2007;131:633-6
34. MOREAU P., ADRIAN-CABESTRE F., MENIER C., GUIARD V., GOURAND L., DAUSSET J., CAROSELLA E.D., PAUL P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. **Int Immunol** 1999;11:803-11.
35. YANG Y., CHU W., GERAGHTY D.E., HUNT J.S. Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma. **J Immunol**. 1996;156:4224-31.
36. LEFEBVRE S., BERRIH-AKNIN S., ADRIAN F., MOREAU P., POEA S., GOURAND L., DAUSSET J., CAROSELLA E.D., PAUL P. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. **J Biol Chem** 2001;276:6133-9.
37. MOREAU P., FAURE O., LEFEBVRE S., IBRAHIM E.C., O'BRIEN M., GOURAND L., DAUSSET J., CAROSELLA ED., PAUL P. Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts. **Transplant Proc**, 2001;33:2277-80.

38. YIE S.M., LI L.H., LI G.M., XIAO R., LIBRACH C.L. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro. **Hum Reprod.**, 2006;21:46-51.
39. YIE S.M., XIAO R., LIBRACH C.L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Hum Reprod.** 2006; 21:2538-44.
40. MARCHAL-BRAS-CONCALVES R., ROUAS-FREISS N., CAROSELLA E.D., KIRSZENBAUN M., GUILLET J. A soluble HLA-G protein that inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Transplant Proc.** 2001. 33:2355–2359.
41. LILA N., ROUAS-FREISS N., DAUSSET J. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cell regulatory mechanism. **Proc Natl Acad Sci USA.**,2001.98,p.12150-12155.
42. LeROND S., AZÉMA C., KRAWICE-RADANNE I., DURRBACH A., GUETTIER, C., CAROSELLA E.D.,ROUAS-FREISS N. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. **The Journal of Immunology.** 2006. 176, p.3266-3276.
43. LEMAULT J., KRAWICE-RADANNE I., DAUSSET J., CAROSELLA E.D. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004;101(18):7064-9.
44. NAJI A., ROND S.L., DURRBACH A., KRAWICE-RADANNE I., CREPUT C., DAOUYA M., CAUMARTIN J., LEMAULT J., CAROSELLA E.D., ROUAS-FREISS N. CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. **Blood.** 2007.1;110(12):3936-48.
45. SELMANI Z., NAJI A., ZIDI I., FAVIER B., GAIFFE E., OBERT L.,ROUAS-FREISS N., CAROSELLA E., DESCHASEAUX F. Human Leukocyte Antigen-G5 Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells Is Required to Suppress T Lymphocyte and Natural Killer Function and to Induce CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T Cells. **STEM CELLS.** 2008. 26:212–222.
46. COLONNA M., SAMARIDIS J., CELLA M., ANGMAN L., ALLEN R.L., O'CALLAGHAN C.A., DUNBAR R., OGG, CERUNDOLO V. ROLINK A. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. **J Immunol.** 1998 160, 3096-100.
47. ALLAN D.S., COLONNA M., LANIER L.L., CHURAKOVA T.D., ABRAMS J.S., ELLIS S.A., MCMICHAEL A.J., BRAUD V.M. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen HLA-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. **Journal Exp Med.** 1999. vol. 189, p.1149-56.
48. LeMAULT J., AZÉMA C., KRAWICE-RADANNE I., DURRBACH A., GUETTIER C., CAROSELLA E.D., ROUAS-FREISS N. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. **The Journal of Immunology.**2005.176,p.3266-3276.
49. MALLET V., BLASCHITZ1 A., CRISA L., SCHMITT C., FOURNEL S., KING A., LOKE Y.W., DOHR1 G., LE BOUTEILLER P. HLA-G in the human thymus: a subpopulation of medullary epithelial but not CD83F dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein; **International Immunology.** 1999; 6: 889–898.
50. COUPEL S., MOREAU A., HAMIDOU M., HOREJSI V., SOULILLOU J.P., CHARREAU B. The HLA-Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. **Blood.** 2007.109(7),p.2806-14.
51. BRAUD V.M., ALLAN D.S., O'CALLAGHAN C.A., SODERSTROM 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,** 1998a 391, 795-9.
52. BRAUD V.M., ALLAN D.S., WILSON D., MCMICHAEL A.J. TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. **Curr Biol.** 1998b, vol.8, p.1-10.
53. LEE N., MALACKO A.R., SHITANI A., CHEN M.C., BAJORATH J., MARQUARDT H., GERAGHTY D.E. The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. **Immunity.** 1995, vol.3,p. 591-600.

54. ULBRECHT M., HONKA T., PERSON S., JOHNSON J.P., WEISS E.H. HLA-E gene encodes two differentially regulated transcripts and a cell surface protein. **J Immunol.** 1992, vol.149(9),p.2945-53.
55. BRAUD VM. HLA-E binds to Natural Killer cell receptors CD94/NKG2A. **Nature**, 1998 391: 795-799.
56. BORREGO S. S., ME. R., GIMM A. O., LOPEZ-ALONSO, M., ANTINOLO, G., ENG C. HLA-E is the ligand for the natural killer cell CD94/NKG2 receptors. **J Biomed Sci.** 1998, vol.5(5), p.321-31.
57. HU D., IKIZAWA K., LU L., SANCHIRICO M.E.; SHINOHARA M.L., Cantor H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. **Nat Immunol.** 2004, vol.5(5),p.516-23.
58. PANOUTSAKOPOULOU V., HUSTER K.M., MCCARTY N., FEINBERG E., WANG R., WUCHERPFENNIG K.W., CANTOR H. Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. **J Clin Invest.** 2004,vol.113 (8),p.1218-24.
59. SARANTOULOS S., LU L., CANTOR H. Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells. **J Clin Invest.**2004;114(9), p.1218-21.
60. MATHIS D., BENOIST C. Aire. **Annu. Rev. Immunol.** 2009. 27:287–312.
61. STROYNOWSKI I., TABACZEWSKI P. Multiple products of the class Ib Qa-2 genes: Which ones are functional? **Res Immunol.** 1996. 147:290.
62. ANITA Q. GOMES D. V. CORREIA B.S. Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance **Rep.** 2007. 8(11): 1024–1030.3
63. LU L., WERNECK M.B., CANTOR H.The immunoregulatory effects of Qa-1. **Immunol Rev.** 2006. 212: 51-9.
64. FLAHERTY L. L. Immunogenetics of the Q and TL regions of the mouse. **Rev Immunol**, 1990. 10:131-175.
65. KUMANOVICS A. Quod ert faciendum: sequence analysis of the H2-D and H2-Q regions of 129/SvJ mice. **Immunogenetics**, 2002 54: 479-489.
66. LAMPTON P., GOLDSTEIN C., WARNER C. The role of tapasin in MHC class I protein trafficking in embryos and T cells. **Journal of Reproductive Immunology.** 2008. (78) 28–39.
67. COMISKEY M. Evidence that HLA-G is the functional homolog of mouse Qa-2, the Ped gene product. **Human immunology**, 2003. 64, 999-1004.
68. HAHN ET Al. Anti-Qa-2 induced T cell activation: the parameters of activation, th definiton of mitogenic and non mitogenic antibodies, and the diferential effects on CD4 vs CD8 T cells. **J Immunol.** 1989. 143:407-413.
69. VIDOVIC D.Qa-1 restricted recognition of forenign antigen bty gamma-delta T-cell hybridoma. **Nature**, 1989 340:646-650.
70. TIAN H.Physical and molecular genetic analysis of Qa-2 antigen expression: multiple factors controlling cell surfacelevels. **Mol Immunol.** 1991.28: 845-854.
71. WU L. Identification of two Major Histocompatibility Complex Class Ib Genes, Q7 and Q9, as the Ped gene in the mouse. **Bio reproduction.** 1999. 60: 1114-1119.
72. TIAN ZI. Removal of Qa-2 antigen alters the ped gene phenotype of preimplantataion mouse embryos. **Bio Reprod**, 1992. 47:271-276.
73. THREEDANUJ U. Widespread expression of the nonclassical class I Qa-2 antigens in hemopoietic and nonhemopoietic cells **Immunogenetics**, 2001. 53:455–467
74. GE Q., CHEN. W. F.Phenotypic identification of the subgroups of murine T-cell receptor ab + CD4 + CD8 - thymocytes and its implication in the late stage of thymocyte development. **Immunology** 1999. 97 665-671.

75. COMISKEY M. HLA-G is found in lipid rafts and can act as a signaling molecule. **Hum. Immunol**, 2007. 68:1-11.
76. ROBINSON P.J. A glycosphospholipid anchor is required for a Qa-2 mediated T-cell activation. **Nature**, 1989. 342: 85.
77. MCELHINNY A.S. Painting Qa-2 onto ped slow preimplantation embryos increases the rate of cleavage. **Am J Reprod Immunol**, 2000. 44: 52.
78. GERATHY D.E. A human major histocompatibility complex classe I gene that encodes a protein with shortened cytoplasmic segment. **Proc Natl Acad Sci**. 1987. 84:9145.
79. CLEMENTS CS et al. Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. **Proc Natl Acad Sci**, 2005. 102: 3360,.
80. ROBINSON P.J. A glycosphospholipid anchor is required for Qa-2 mediated T-cell activation. **Nature**, 1989. 342: 85.
81. FLAHERTY L.L. The Tla region of the mouse: identification of a new serologically defined locus, Qa-2. **Immunogenetics**, 1976. 3:533-539
82. KINCADE P.W. Qa antigen expression on functional lymphoid, myeloid and stem cells in adult mice. **J immunol**, 1980. 124:2879-2885.
83. WIDACKI S.M, COOK R.G. NH2-terminal aminoacid sequence analysis of Qa-2 alloantigens. **Immunogenetics**, 1989. 29:206-209.
84. CHIANG E.Y. The nonclassical major histocompatibility complex molecule Qa-2 protects tumor cell-mediated cytotoxicity. **J. Immunol**, 2002 168:2200-2211.
85. WATKINS A., WILKINS A., OSMOND C., WARNER C., COMISKEY M., HANSON M., FLEMING T. The influence of mouse Ped gene expression on postnatal development. **J Physiol**, 2006. 571.1 .pp 211-220
86. NAN LU. Qa-2 mRNA in peripheral blood mononuclear cells: A potential marker of acute allograft rejection. **Med Sci Monit**, 2009; 15(4): BR99-105
87. POUSSIER P. A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity. **J Exp Med**. 2002 195:1491-1497.
88. TAIN T. Heterogeneity within medullary-type TCRab+CD3+CD4-CD8+ thymocytes in normal mouse thymus. **International immunology**, vol 13, No 3, pp 313-320.2000
89. QING G.E., WEI-FENG C. Effect of murine thymic epithelial cell line on the functional expression of CD4+ CD8- thymocyte subgroups. **International Immunology**, Vol 12. 1127-1133. The Japanese Society for immunology.
90. ZAPPACOSTA F., TABACZEWSKI P., PARKE K., COLIGAN J., STROYNOWSKI I. The murine liver-specific nonclassical MHC class I molecule Q10 binds a classical peptide repertoire. **The journal of immunology**, 2000, 164:1906-1915.
91. LEW A.M., MALOY L., COLIGAN J.E. Characteristics of the expression of the murine soluble class I molecule Q10. **The journal of immunology**, 1986. 136 -1.
92. WIETIES K., HAMMER R.E., SHARON J.Y., FORMAN J. Peripheral tolerance in mice expressing a liver-specific class I molecule: inactivation/deletion of a T-cell subpopulation. **PNAS**, 1990 Vol 87-6604-6608.
93. MANN D.W., STROYNOWSKI Y., HOOD L., FORMAN J. Cytotoxic lymphocytes from mice with soluble class I Q10 molecules in their serum are not tolerant to membrane-bound Q10. **The journal of immunology**, 1987. vol.138, 240-245.
94. LU L., WERNECK M.B., CANTOR H. The immunoregulatory effects of Qa-1. **Immunol Rev**. 2006. 212: 51-9.
95. HERMEL E., ALDRICH C. Polymorphism and conservation of the genes encoding Qa1 molecules. **Immunogenetics**. 2004. 56: 639-649

96. HU D., IKIZAWA K., LU L.; SANCHIRICO M.E., SHINOHARA M.L., CANTOR H. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. **Nat Immunol.**,2004.5(5),p.516-23, 4.
97. TREVOR R.F., KUMAR S.P. Revival of CD8+Treg-mediated suppression. **Trends in Immunology**, 2008. 29 .(7).
98. LU L., CANTOR C.Generation and Regulation of CD8 + Regulatory T Cells.**Cellular & Molecular Immunology**, 2008;5(6):401-406.
99. JIANG H., CHESS L. Qa-1/HLA-E-restricted regulatory CD8 T cells and self-nonself discrimination: An essay on peripheral T-cell regulation. **Human Immunology**, 2008 (69). 721-727
100. SUBHASIS C., O'ROURKE J., CONE R..Implication for the CD94/NKG2A-Qa-1 system in the generation and function of ocular-induced splenic CD8 regulatory T cells.**International Immunology**, (20), 4, pp. 509-516.
101. RIOUX J. D. E., ABBAS A. K.. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. **Nature**, 2005..(435), 7042, 2,584-9.
102. VILLA-VERDE D.M., MELLO-COELHO V., LAGROTA-CÂNDIDO J.M., CHAMMAS R., SAVINO W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. **Braz J Med Biol**, 1995; Res 28(8):907-12.
103. ABBAS A.K., LICHTMAN A.H.. Cellular and Molecular Immunology. 5a Ed., 2005. **WB Saunders** Co. Philadelphia. USA.
104. ANDERSON G., JENKINSON W.E., JONES T., PARNELL S.M., KINSELLA F.A.M., WHITE A.J., PONGRAC'Z J.E., ROSSI S.W., JENKINSON E.J. Establishment and functioning of intrathymic microenvironment. **Immunol Reviews**, 2006; 209:10-27.
105. GORDON J., BENNETT A.R., BLACKBURN C.C., MANLEY N.R.. Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. **Mech Dev**, 2001; 103(1-2):141-143.
106. MANLEY N.R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. **Semin Immunol**. 2000. 12(5):421-428.
107. ITOI M., KAWAMOTO H., KATSURA Y., AMAGAI T. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. **Int Immunol**, 2001 ; 13(9):1203-11.
108. BODEY B, BODEY B JR, SIEGEL SE, KAISER HE. Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging. **In Vivo**, 1997; 11(5):421-40.
109. SAVINO W, MENDES-DA-CRUZ DA, SMANIOTTO S, SILVA-MONTEIRO E, VILLA-VEDE DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and xtracellular matrix. **J. Leukoc Biol**, 2004. 75(6):95161
110. ANDERSON G, JENKINSON WE, JONES T, PARNELL SM, KINSELLA FAM, WHITE AJ, PONGRAC'Z JE, ROSSI SW, JENKINSON EJ. Establishment and functioning of intrathymic microenvironment. **Immunol Reviews**, 2006. 209:10-27.
111. SAVINO W, MENDES-DA-CRUZ DA, SILVA JS, DARDENNE M, COTTA-DE-ALEMIDA V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matri and chemokines? **Trends Immunol**. 2002; 23(6):305-313.
112. HOLLANDER G.A. Claudins provide a breath of fresh Aire. **Nature Immunology**, 2001. 8(3)234-236.
113. DERBINSKI J., SCHULTE A., KYEWSKI B., KLEIN L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the preipheral self. **Nature immunology**, 2001.2: 1032-1039.
114. GOTTER J., BRORS B., HERGENHAHN M., HYEWSKI B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes co-localized in chromossomal clusters. **J. Exp. Med**, 2004. 199:155-166.
115. KYEWSKI B., DERBINSKI J. Self-representation in the thymus: an extended view. **Nature Reviews**. 2004. (4) 696- 4.



116. MAGALHÃES, DAR. Análise do transcriptoma durante a ontogenia do timo. 2007. 151p. Tese (Doutorado em GENética) - **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto.
117. GARDNER J., FLETCHER A., ANDERSON M., TURLEY S. AIRE in the thymus and beyond. **Current Opinion in Immunology**, 2009; 21:582–589
118. BRUNO KYEWSKI. A Breath of Aire for the Periphery. **SCIENCE**, 2008. 321.
119. ABRAMSON J., GIRAUD M., BENOIST C., MATHIS D. Aire's Partners in the Molecular Control of Immunological Tolerance. **Cell**. 2010 ;140(1):123-35.
120. MUSCO G., PETERSON P. PHD finger of autoimmune regulator: An epigenetic link between the histone modifications and tissue-specific antigen expression in thymus. **Epigenetics**. 2008; 3(6): 310–314.
121. JANEWAY P., TRAVERS M., WALPORT M., SHLOMCHIK. **Immunobiologia**. 2002. 5ª ed., ArtMed.
122. ROUGH R. The mouse. Its reproduction and development. **Burgess publishing company**, 1968.
123. SAMBROOK J., FRITCH E.F, MANIATS T. Molecular Cloning. a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Press**, 1989. New York.
124. APPLIED BIOSYSTEMS APLICATION NOTE. Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays - TaqMan Gene Expression Assays Average 100% efficiency.(Part number 105622). **Applied Biosystems, USA, publication**, 2006. 127-05.
125. LIVAC K.J, SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**. 2001; 25:401-408
- 126 . LEFEBVRE S., ADRIAN F., MOREAU P., GOURAND L., DAUSSET J., CAROSELLA E.D., PAUL P. Modulation of HLA-G Expression in Human Thymic and Amniotic Epithelial cells. **Human immunology** , 2000; 61, 1095-1101.
127. OHTSUKA M., INOKO H., YOSHIMURA S. Major histocompatibility complex (MHC) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strains C57BL/6. **BMC Genomics** 2008, 9:178.
128. SPRENT J., GAO E-K., WEBB S.R. T cell reactivity to MHC molecules: Immunity versus tolerance. **Science** 1990; 248:1357.
129. CARDOSO R.S., MAGALHÃES D.A.R., BAIÃO A.M.T., JUNTA C.M., MACEDO C., MÁRCIA C.M., SAKAMOTO-HOJO E.T., DONADI E.A., PASSOS G.A.S. Onset of promiscuous gene expression in murine fetal thymus organ culture. **Molecular Immunology** 2006; 119:369–375.
130. SHORTMAN K., WU L. Early T lymphocyte progenitor. **Annu Rev. Immunol**, 1996. 14: 29-47.
131. GUERAU-DE-ARELLANO M., BENOIST C, MATHIS D. Neonatal tolerance revisited: a perinatal window of Aire control of autoimmunity. **J.Exp. Med**, 2009; 206: 12450-1252.
132. MAGALHAES D.A.R., MACEDO C., JUNTA M.C., MARQUES M.M.C., HOJO E.T.S. DONADI E.A, PASSOS G. A.S. Hybridization signatures during thymus ontogeny reveals modulation of genes coding for T-cell signaling proteins. **Molecular immunology**, 2005; 42, 1043-104.
133. WHITE A., WITHERS D.R., JENKINSON E., ANDERSON, G. Sequential phases in the development of Aire – expressing medullary thymic epithelial cells involve distinct cellular input. **Eur j. immunol**, 2008. 38:942-947.
134. O'CALLAGHAN C.A., BELL J.I. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G **Immunological Reviews**, 1998; 163: 129-138.
135. GUERAU-DE-ARELLANO M., BENOIST C. Transcriptional impact of Aire varies with cell type. **PNAS**, 2008 ; 105, 37.

136. Moreau P., MOUILLOT G, ROUSSEAU P., MARCOU C., DAUSSET J., CAROSELLA E.D. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003;100:1191-6.
137. BOUCRAUT J., GUILLAUMEUX T., ALIZADEH M., BORETTO J., CHIMINI G., MALECAZE F., SEMANA G., FAUCHET R., PONTAROTTI P., LE BOUTEILLER P. HLA-E is the only class I gene that escapes CpG methylation and is transcriptionally active in the trophoblast-derived human cell line JAR. **Immunogenetics**. 1993;38:117-30.
138. MITSURU MATSUMOTO. The role of autoimmune regulator (Aire) in the development of the immune system. **Microbes and Infection**., 2009; 11. 928-934
139. FERGUSON B., COOKE A., PETERSON P., RICH T. Death in the AIRE. **Trends in Immunology**, 2008;v.9 -7.
140. DRAYTON D., LIAO S., MOUNZER R., RUDDLE N. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. **Nature Immun**, 2006.(7), 4.
141. CUPEDO T., KRAAL G., MEBIUS R. The role of CD45+CD4+CD3- cells in lymphoid organ development. **Immunological Reviews**, 2002; 189: 41–50.
142. NEMETH E., BAIRD A., O'FARRELLY C. Microanatomy of the liver immune system. **Semin Immunopathol**, 2009; 31:333–343.
143. IAN NICHOLAS CRISPE. The Liver as a Lymphoid Organ. **Annu. Rev. Immunol**, 2009. 27:147–63.
144. HYATT M., BUDGE H., SYMONDS E. Early developmental influences on hepatic organogenesis. **Organogenesis**. 2008. 4:3, 170-175
145. WITTIG B.M., ZEITZ M. The gut as an organ of immunology. **Int J Colorectal Dis**, 2003. 18:181–187.
146. ARCK P., GILHAR A., BIENENSTOCK J., PAUS R. The alchemy of immune privilege explored from a neuroimmunological perspective. **Current Opinion in Pharmacology** 2008, 8:480–489.
147. HIBY S., KING A., SHARKEY A., LOKE Y.W. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. **Tissue Antigens** 1999;53:1 .
148. KINCADE P., FLAHERTY L., LEE G., WATANABE T., MICHAELSON J. Qa antigen expression on functional lymphoid, myeloid, and stem cells in adult mice. **J. Immunol**. 1980. 124-6.
149. KÖCKRITZ-BLICKWEDE M., ROHDE M., OEHMCKE S., MILLER L.S., CHEUNG A.L., HERWALD A., FOSTER S., MEDINA M. Immunological Mechanisms Underlying the Genetic Predisposition to Severe *Staphylococcus aureus* Infection in the Mouse Model. **Am J Pathol**. 2008 ; 173(6): 1657–1668.
150. HARLAN X.S., JONES P., HODGE L.M., SIMECKA JW. Cytokine and Chemokine Transcription Profile during *Mycoplasma pulmonis* Infection in Susceptible and Resistant Strains of Mice: Macrophage Inflammatory Protein 1 $\beta$  (CCL4) and Monocyte Chemoattractant Protein 2 (CCL8) and Accumulation of CCR5<sup>+</sup> Th Cells. **Infect Immun**. 2006 October; 74(10): 5943–5954.
151. CANGUSSÚ S.D., SOUZA C.C., CAMPOS C.F., VIEIRA L.Q., AFONSO L.C., ARANTES R.M. Histopathology of *Leishmania major* infection: revisiting *L. major* histopathology in the ear dermis infection model. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2009. 104(6): 918-922.

# APÊNDICES

## APÊNDICE A - RAZÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES ENDÓGENOS NAS AMOSTRAS.

**Tabela A** – Estabilidade da expressão dos genes endógenos de acordo com a idade dentro de um mesmo órgão. \*Razão: quanto mais próxima do valor 1 mais estável/menos variável. \*\*ENDO: média geométrica entre *GAPDH* e *ACTB*.

| Timo         |           |            | Fígado       |              |            |
|--------------|-----------|------------|--------------|--------------|------------|
| Média Cts    |           | Razão (~1) | Média Cts    |              | Razão (~1) |
| <b>GAPDH</b> |           |            | <b>GAPDH</b> |              |            |
| <b>E14.5</b> | <b>60</b> |            | <b>E14.5</b> | <b>60</b>    |            |
| 17.613       | 20.761    | 0.84836180 | 18.057       | 18.173       | 0.99361690 |
| <b>ACTB</b>  |           |            | <b>ACTB</b>  |              |            |
| <b>E14.5</b> | <b>60</b> |            | <b>E14.5</b> | <b>60</b>    |            |
| 17.9555      | 19.545    | 0.91867485 | 17.462       | 18.415       | 0.94827445 |
| <b>ENDO</b>  |           |            | <b>ENDO</b>  |              |            |
| <b>E14.5</b> | <b>60</b> |            | <b>E14.5</b> | <b>60</b>    |            |
| 21.17314     | 20.05611  | 0.94724320 | 17.75701     | 18.29132     | 0.97078881 |
| Intestino    |           |            | Cérebro      |              |            |
| Média Cts    |           | Razão (~1) | Média Cts    |              | Razão (~1) |
| <b>GAPDH</b> |           |            | <b>GAPDH</b> |              |            |
| <b>E14.5</b> | <b>60</b> |            | <b>E14.5</b> | <b>60</b>    |            |
| 16.196       | 17.886    | 0.90551269 | 17.473       | 16.153       | 0.92445487 |
| <b>ACTB</b>  |           |            | <b>ACTB</b>  |              |            |
| <b>E14.5</b> | <b>60</b> |            | <b>E14.5</b> | <b>60</b>    |            |
| 16.257       | 15.981    | 0.98299194 | 15.699       | 16.035       | 0.97904583 |
| <b>ENDO</b>  |           |            | <b>ENDO</b>  |              |            |
| <b>E14.5</b> | <b>60</b> |            | <b>E14.5</b> | <b>60</b>    |            |
| 16.22647     | 16.8968   | 0.96032804 | 16.56227     | 16.09328     | 0.97168372 |
| Baço         |           |            | Placenta     |              |            |
| Média Cts    |           | Razão (~1) | Média Cts    |              | Razão (~1) |
| <b>GAPDH</b> |           |            | <b>GAPDH</b> |              |            |
| <b>1</b>     | <b>60</b> |            | <b>E13.5</b> | <b>E20.5</b> |            |
| 21.254       | 19.938    | 0.93808224 | 18.028       | 19.584       | 0.92054738 |
| <b>ACTB</b>  |           |            | <b>ACTB</b>  |              |            |
| <b>1</b>     | <b>60</b> |            | <b>E13.5</b> | <b>E20.5</b> |            |
| 18.333       | 16.458    | 0.89772541 | 17.137       | 17.956       | 0.95438850 |
| <b>ENDO</b>  |           |            | <b>ENDO</b>  |              |            |
| <b>1</b>     | <b>60</b> |            | <b>E13.5</b> | <b>E20.5</b> |            |
| 19.73954     | 18.10159  | 0.91702151 | 17.57686     | 18.75234     | 0.93731523 |

**Tabela B** – Estabilidade da expressão dos genes endógenos entre o timo e os diferentes órgãos de idades equivalentes (60 dias). \*Razão: quanto mais próxima do valor 1 mais estável/menos variável. \*\*ENDO: média geométrica entre *GAPDH* e *ACTB*.

| Média Cts    |               | Razão (~1)  |
|--------------|---------------|-------------|
| <b>GAPDH</b> |               |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Fígado</b> |             |
| 20.761       | 18.173        | 0.875360057 |
| <b>ACTB</b>  |               |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Fígado</b> |             |
| 19.545       | 18.415        | 0.94215912  |
| <b>ENDO</b>  |               |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Fígado</b> |             |
| 20.05611     | 18.29132      | 0.912007388 |

| Média Cts    |                  | Razão (~1)  |
|--------------|------------------|-------------|
| <b>GAPDH</b> |                  |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Intestino</b> |             |
| 20.761       | 17.886           | 0.861535794 |
| <b>ACTB</b>  |                  |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Intestino</b> |             |
| 19.545       | 15.981           | 0.817625991 |
| <b>ENDO</b>  |                  |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Intestino</b> |             |
| 20.05611     | 16.8968          | 0.842476518 |

| Média Cts    |                | Razão (~1)  |
|--------------|----------------|-------------|
| <b>GAPDH</b> |                |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Cérebro</b> |             |
| 20.7606      | 16.153         | 0.778060364 |
| <b>ACTB</b>  |                |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Cérebro</b> |             |
| 19.545       | 16.035         | 0.820414428 |
| <b>ENDO</b>  |                |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Cérebro</b> |             |
| 20.05611     | 16.09328       | 0.802413068 |

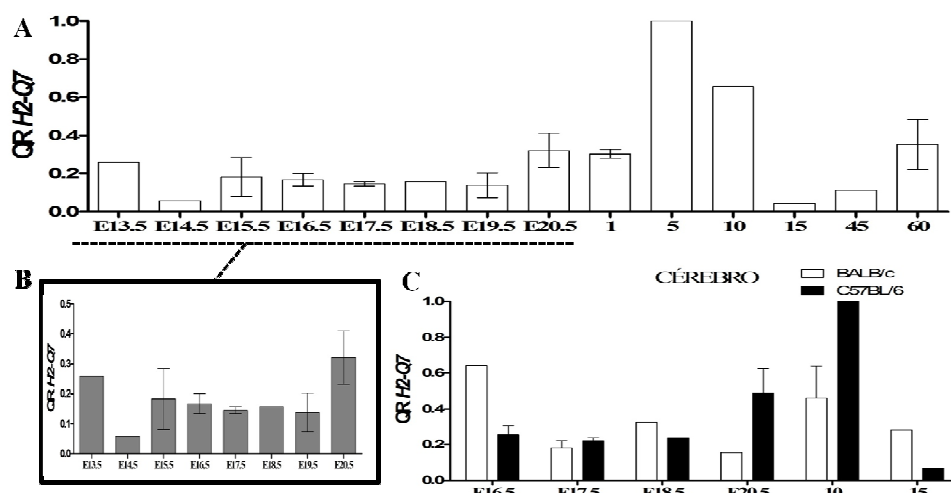
| Média Cts    |             | Razão (~1)  |
|--------------|-------------|-------------|
| <b>GAPDH</b> |             |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Baço</b> |             |
| 20.7606      | 19.938      | 0.960376868 |
| <b>ACTB</b>  |             |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Baço</b> |             |
| 19.545       | 16.458      | 0.842056792 |
| <b>ENDO</b>  |             |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Baço</b> |             |
| 20.05611     | 18.10159    | 0.90254728  |

| Média Cts    |                 | Razão (~1)  |
|--------------|-----------------|-------------|
| <b>GAPDH</b> |                 |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Placenta</b> |             |
| 17.6125      | 18.028          | 0.976952518 |
| <b>ACTB</b>  |                 |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Placenta</b> |             |
| 17.9555      | 17.956          | 0.999972154 |
| <b>ENDO</b>  |                 |             |
| <b>Timo</b>  | <b>Placenta</b> |             |
| 21.17314     | 18.75234        | 0.885666723 |

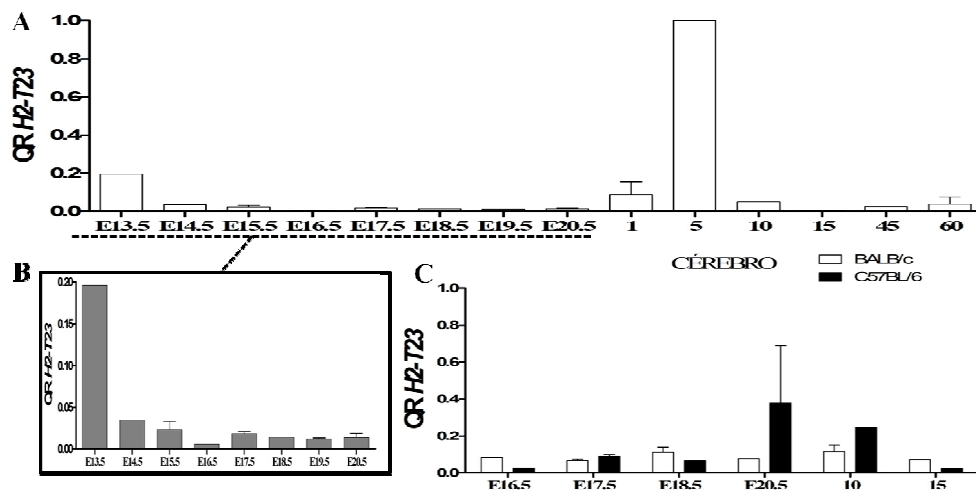
**Tabela C** – Estabilidade da expressão dos genes endógenos entre os animais C57BL/6 e BALB/c.  
 \*Razão: quanto mais próxima do valor 1 mais estável/menos variável. \*\*ENDO: média geométrica entre GAPDH e ACTB.

| Timo           |               |            | Fígado         |               |            |
|----------------|---------------|------------|----------------|---------------|------------|
| Média Cts      |               | Razão (~1) | Média Cts      |               | Razão (~1) |
| <b>GAPDH</b>   |               |            | <b>GAPDH</b>   |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 18.213         | 19.187        | 0.94923760 | 19.383         | 18.466        | 0.953      |
| <b>ACTB</b>    |               |            | <b>ACTB</b>    |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 20.51568       | 18.902        | 0.92134043 | 18.837         | 18.130        | 0.96241650 |
| <b>ENDO</b>    |               |            | <b>ENDO</b>    |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 19.44029       | 19.02214      | 0.97849056 | 19.0896        | 18.29536      | 0.95839389 |
| Intestino      |               |            | Cérebro        |               |            |
| Média Cts      |               | Razão (~1) | Média Cts      |               | Razão (~1) |
| <b>GAPDH</b>   |               |            | <b>GAPDH</b>   |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 17.893         | 21.456        | 0.83394892 | 18.193         | 17.827        | 0.97991922 |
| <b>ACTB</b>    |               |            | <b>ACTB</b>    |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 16.754         | 19.795        | 0.84639251 | 16.571         | 17.291        | 0.95832470 |
| <b>ENDO</b>    |               |            | <b>ENDO</b>    |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 17.30493       | 20.59949      | 0.84006616 | 17.35068       | 17.55534      | 0.98834187 |
| Baço           |               |            | Placenta       |               |            |
| Média Cts      |               | Razão (~1) | Média Cts      |               | Razão (~1) |
| <b>GAPDH</b>   |               |            | <b>GAPDH</b>   |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 20.362         | 20.628        | 0.98711460 | 18.474         | 21.206        | 0.87114495 |
| <b>ACTB</b>    |               |            | <b>ACTB</b>    |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 16.619         | 16.367        | 0.98484848 | 17.151         | 16.165        | 0.94249690 |
| <b>ENDO</b>    |               |            | <b>ENDO</b>    |               |            |
| <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            | <b>C57BL/6</b> | <b>BALB/c</b> |            |
| 18.38606       | 18.3744       | 0.99936591 | 17.79958       | 18.51472      | 0.96137440 |

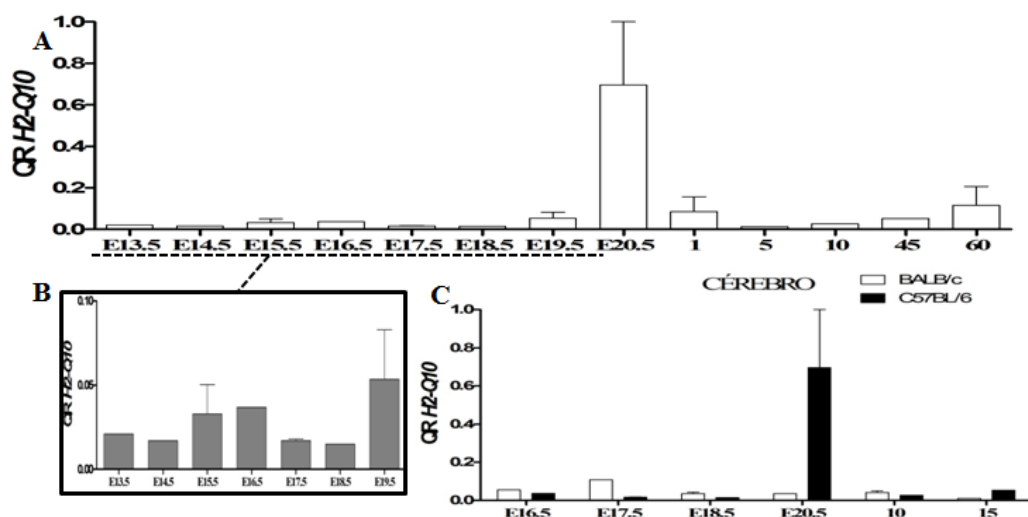
**APÊNDICE B** – Perfil de expressão gênica de *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* no cérebro de animais C57BL/6 e BALB/c em diferentes idades.



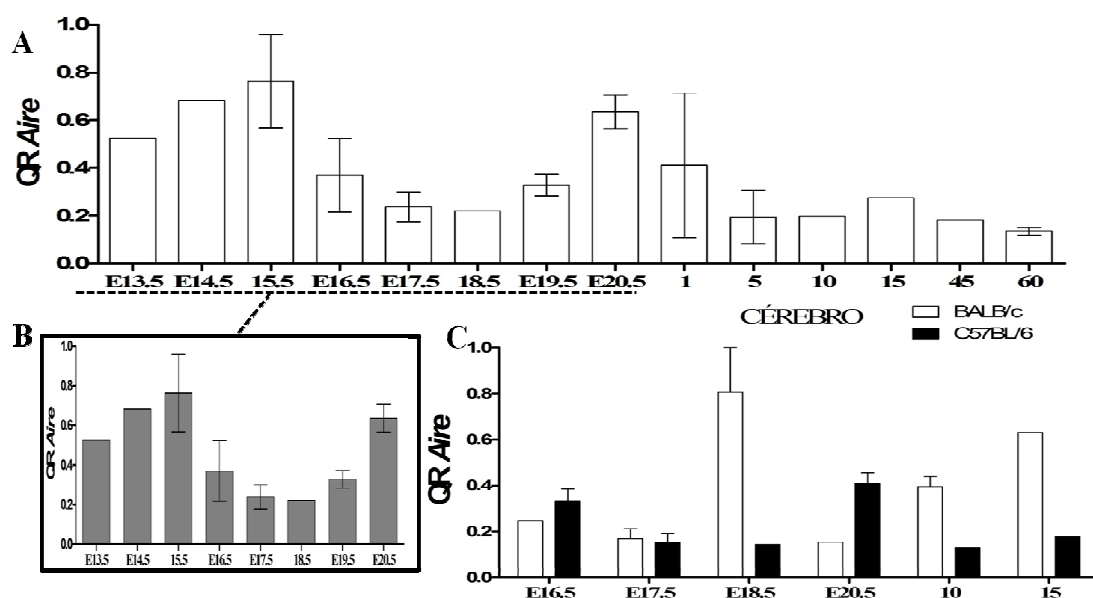
**Figura 37.** Perfil de expressão do gene *H2-Q7* durante o desenvolvimento do cérebro. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de mRNA do gene *H2-Q7* durante todo o desenvolvimento do cérebro de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de mRNA do gene *H2-Q7* durante todo o desenvolvimento fetal do cérebro de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q7* durante o desenvolvimento do cérebro de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)



**Figura 38.** Perfil de expressão do gene *H2-Q10* durante o desenvolvimento do cérebro. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de mRNA do gene *H2-Q10* durante todo o desenvolvimento do cérebro de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de mRNA do gene *H2-Q10* durante todo o desenvolvimento fetal do cérebro de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q10* durante o desenvolvimento do cérebro de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)

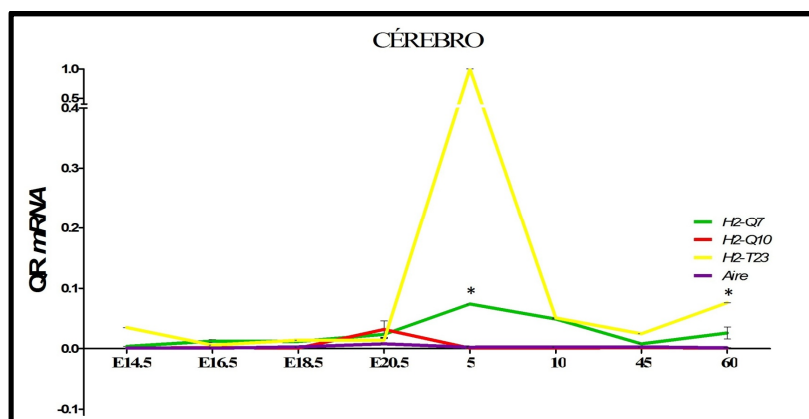


**Figura 39.** Perfil de expressão do gene *H2-T23* durante o desenvolvimento do cérebro. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de mRNA do gene *H2-T23* durante todo o desenvolvimento do cérebro de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de mRNA do gene *H2-T23* durante todo o desenvolvimento fetal do cérebro de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-T23* durante o desenvolvimento do cérebro de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos exposto em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)



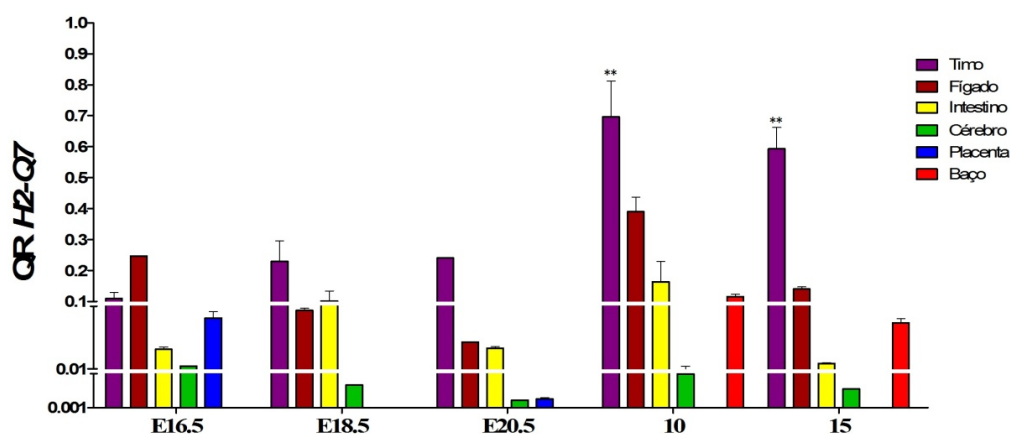
**Figura 40.** Perfil de expressão do gene *Aire* durante o desenvolvimento do cérebro. Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. **A.** Quantificação relativa de mRNA do gene *Aire* durante todo o desenvolvimento do cérebro de animais C57BL/6. **B.** Quantificação relativa de mRNA do gene *Aire* durante todo o desenvolvimento fetal do cérebro de animais C57BL/6. **C.** Comparação dos perfis de expressão de *H2-Q7* durante o desenvolvimento do cérebro de animais C57BL/6 e BALB/c. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos exposto em relação ao calibrador. Os valores próximos do nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) estão marcados com (\*). ( $P < 0,0001$ ) marcados com (\*\*\*)



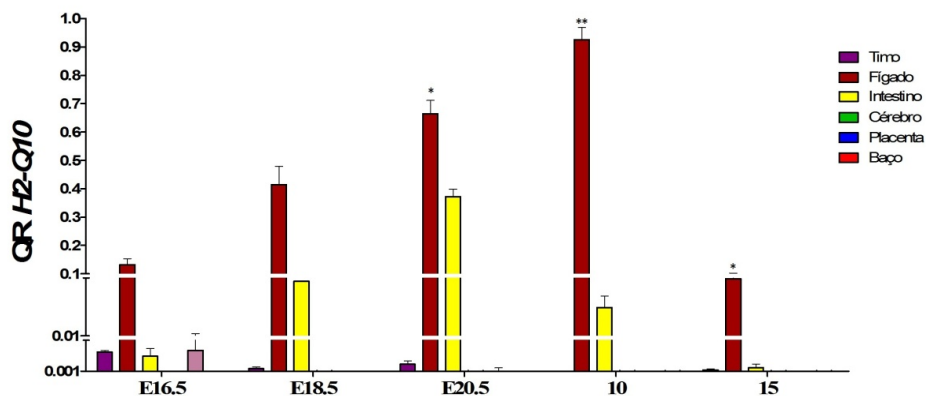


**Figura 41.** Perfis de expressão dos genes *H2-Q7*, *H2-Q10*, *H2-T23* e *Aire* em cérebros de animais C57BL/6 em diferentes idades. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) estão representadas com (\*).

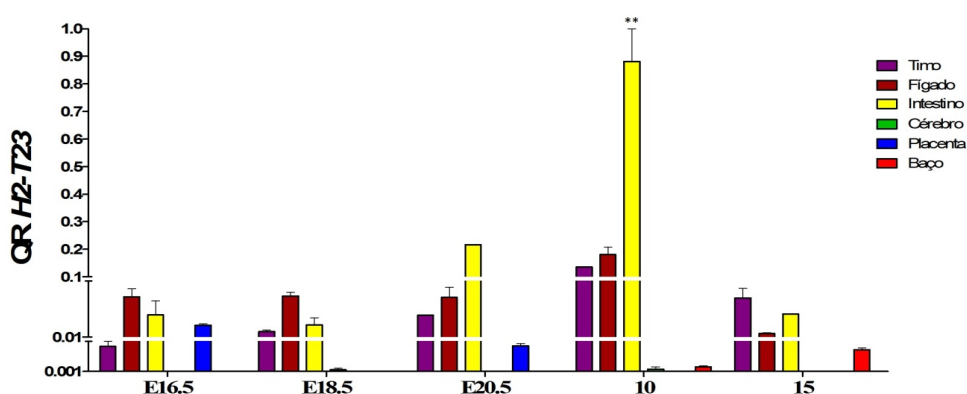
**APÊNDICE C –** Quantificação relativa do RNAm de *H2-Q7*, *H2-T23*, *H2-Q10* e *Aire* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c.



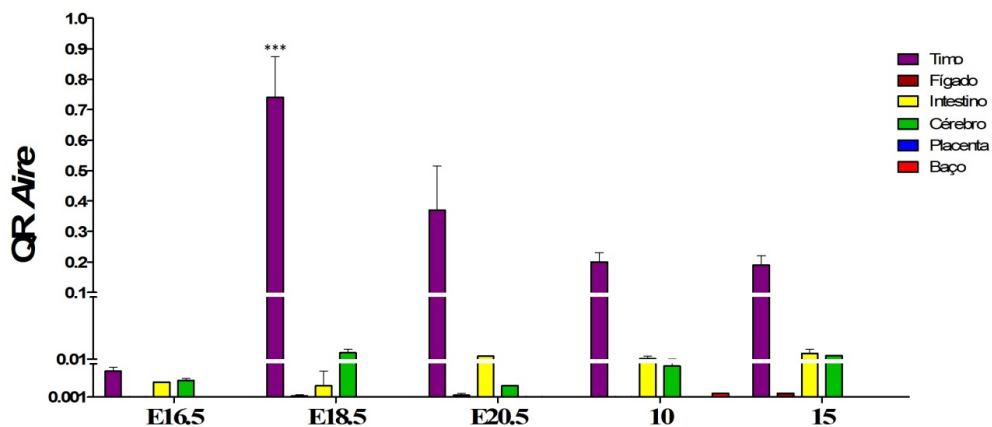
**Figura 42.** Quantificação relativa do RNAm de *H2-Q7* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c. (§) Cada coluna representa a média de duas ou mais amostras independentes. QR= Quantificação relativa representativo da média dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  expressos em vezes mais ou menos expresso em relação ao calibrador. As diferenças estatísticas segundo o teste two-way ANOVA ( $p < 0,01$ ) estão representadas com (\*\*) e ( $p < 0,05$ ) com (\*). §Para baço os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades 10 e 15 dias. Para placenta, os níveis de mRNA foram avaliados somente nas idades E16.5 e E20.5 dias.



**Figura 43.** Quantificação relativa do RNAm de *H2-Q10* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c. (S)



**Figura 44.** Quantificação relativa do RNAm de *H2-T23* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c. (S)



**Figura 45.** Quantificação relativa do RNAm de *Aire* durante o desenvolvimento de diferentes órgãos em animais BALB/c. (S)

## APÊNDICE D – VARIÁVEIS ESTATÍSTICAS

Tabela D – Perfis de expressão gênica analisados pelo teste one way ANOVA – Comparação Bonferroni.

| TIMO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q7 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |       |        |        |        |    |        |       |        |
|--|--------|---------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|----|--------|-------|--------|
| Idade  | E14.5  | E15.5   | E16.5  | E17.5 | E18.5  | E19.5 | E20.5  | 1      | 5      | 10 | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                        | 0.0967 | 0.092   | 0.0785 | 0.007 | 0.1035 | 0.056 | 0.1645 | 0.0243 | 0.0167 |    | 0.032  | 0.219 | 0.9158 |
| Desvio Padrão  | 0.0297 | 0.01414 | 0.0064 | 0.001 | 0.005  | 0.075 | 0.1102 | 0.011  | 0.0042 |    | 0.0129 | 0.13  | 0.1062 |
| Erro Padrão  | 0.0172 | 0.01    | 0.0045 | 5E-04 | 0.0035 | 0.053 | 0.0551 | 0.0063 | 0.0024 |    | 0.0058 | 0.092 | 0.0531 |
| Mediana  | 0.101  | 0.092   | 0.0785 | 0.007 | 0.1035 | 0.056 | 0.1315 | 0.028  | 0.018  |    | 0.034  | 0.219 | 0.9495 |
| N  | 3      | 3       | 3      | 5     | 3      | 3     | 4      | 3      | 3      | 1  | 5      | 3     | 4      |

| TIMO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q10 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |        |        |        |        |        |        |       |        |
|---|--------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| Idade   | E14.5  | E15.5   | E16.5  | E17.5 | E18.5  | E19.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10     | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                         | 0.0344 | 0.1967  | 0.6565 | 0.02  | 0.0172 | 0.3683 | 0.5505 | 0.9955 | 0.525  | 0.0172 | 0.0423 | 0.056 | 0.0425 |
| Desvio Padrão   | 0.006  | 0.09644 | 0.0743 | 0.006 | 0.0018 | 0.0508 | 0.2058 | 0.0064 | 0.0933 | 0.029  | 0.0096 | 0.052 | 0.0174 |
| Erro Padrão   | 0.0027 | 0.05568 | 0.0525 | 0.004 | 0.0008 | 0.0293 | 0.1455 | 0.0045 | 0.0539 | 0.013  | 0.0039 | 0.03  | 0.0071 |
| Mediana   | 0.034  | 0.143   | 0.6565 | 0.02  | 0.016  | 0.339  | 0.5505 | 0.9955 | 0.546  | 0.005  | 0.048  | 0.037 | 0.0395 |
| N   | 5      | 3       | 2      | 2     | 5      | 3      | 2      | 2      | 3      | 5      | 6      | 3     | 6      |

| TIMO - Valores - Perfil de Expressão H2-T23 - C57BL/6 |        |         |       |       |        |        |        |        |        |        |        |       |        |
|---|--------|---------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| Idade   | E14.5  | E15.5   | E16.5 | E17.5 | E18.5  | E19.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10     | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                         | 0.381  | 0.11    | 0.222 |       | 0.206  | 0.23   | 0.354  | 0.4323 | 0.6658 | 0.3185 | 0.6668 | 0.463 | 0.2993 |
| Desvio Padrão   | 0.1345 | 0.04276 | 0.017 |       | 0.0203 | 0.0014 | 0.0057 | 0.0095 | 0.2272 | 0.0869 | 0.1214 | 0.119 | 0.0797 |
| Erro Padrão   | 0.0602 | 0.02138 | 0.012 |       | 0.0091 | 0.001  | 0.004  | 0.0055 | 0.1136 | 0.0435 | 0.0543 | 0.06  | 0.0399 |
| Mediana   | 0.374  | 0.1025  | 0.222 |       | 0.196  | 0.23   | 0.354  | 0.432  | 0.575  | 0.305  | 0.595  | 0.427 | 0.305  |
| N   | 5      | 4       | 2     | 1     | 5      | 2      | 2      | 3      | 4      | 4      | 5      | 4     | 4      |

| TIMO - Valores - Perfil de Expressão Aire - C57BL/6 |        |        |        |       |        |        |       |        |       |      |        |       |        |
|---|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|------|--------|-------|--------|
| Idade   | E14.5  | E15.5  | E16.5  | E17.5 | E18.5  | E19.5  | E20.5 | 1      | 5     | 10   | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                       | 0.1617 | 0.25   | 0.95   | 0.985 | 0.1075 | 0.1367 | 0.02  | 0.0733 | 0.17  | 0.02 | 0.185  | 0.087 | 0.036  |
| Desvio Padrão                                       | 0.0133 | 0.2687 | 0.0707 | 0.021 | 0.0096 | 0.0666 | 0     | 0.0451 | 0.052 | 0    | 0.2114 | 0.032 | 0.0182 |
| Erro Padrão   | 0.0054 | 0.19   | 0.05   | 0.015 | 0.0048 | 0.0384 | 0     | 0.026  | 0.03  | 0    | 0.1057 | 0.019 | 0.0081 |
| Mediana   | 0.16   | 0.25   | 0.95   | 0.985 | 0.105  | 0.12   | 0.02  | 0.07   | 0.2   | 0.02 | 0.095  | 0.1   | 0.03   |
| N   | 6      | 2      | 2      | 2     | 4      | 3      | 2     | 3      | 3     | 5    | 4      | 3     | 5      |

| FÍGADO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q7 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |        |        |        |        |       |        |       |        |
|--|--------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|
| Idade  | E13.5  | E14.5   | E15.5  | E16.5 | E17.5  | E18.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10    | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                          | 0.1355 | 0.1465  | 0.088  | 0.09  | 0.1008 | 0.0625 | 0.112  | 0.0625 | 0.2225 | 0.332 | 0.185  | 1     | 0.91   |
| Desvio Padrão  | 0.0021 | 0.01909 | 0.0052 | 0.035 | 0.0334 | 0.0177 | 0.0382 | 0.005  | 0.012  | 0.041 | 0.0566 | 7E-04 | 0.1032 |
| Erro Padrão  | 0.0015 | 0.0135  | 0.003  | 0.02  | 0.0149 | 0.0125 | 0.027  | 0.0035 | 0.0085 | 0.029 | 0.04   | 5E-04 | 0.073  |
| Mediana  | 0.1355 | 0.1465  | 0.091  | 0.097 | 0.098  | 0.0625 | 0.112  | 0.0625 | 0.2225 | 0.332 | 0.185  | 1     | 0.91   |
| N  | 2      | 2       | 3      | 3     | 5      | 2      | 2      | 2      | 2      | 2     | 2      | 2     | 2      |

| FÍGADO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q10 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |        |        |        |        |        |        |       |        |
|---|--------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| Idade   | E13.5  | E14.5   | E15.5  | E16.5 | E17.5  | E18.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10     | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                           | 0.0188 | 0.02867 | 0.0765 | 0.033 | 0.1156 | 0.0957 | 0.1775 | 0.037  | 0.0918 | 0.1347 | 0.1513 | 0.772 | 0.5723 |
| Desvio Padrão   | 0.0085 | 0.01872 | 0.0288 | 0.024 | 0.0754 | 0.0792 | 0.0799 | 0.0042 | 0.0536 | 0.0381 | 0.0639 | 0.201 | 0.1731 |
| Erro Padrão   | 0.0042 | 0.01081 | 0.0144 | 0.017 | 0.0337 | 0.0457 | 0.0399 | 0.003  | 0.0268 | 0.022  | 0.0369 | 0.116 | 0.0866 |
| Mediana   | 0.018  | 0.021   | 0.0825 | 0.033 | 0.085  | 0.054  | 0.201  | 0.037  | 0.085  | 0.132  | 0.126  | 0.691 | 0.557  |
| N   | 4      | 3       | 4      | 2     | 5      | 3      | 4      | 2      | 4      | 3      | 3      | 3     | 4      |

| FÍGADO - Valores - Perfil de Expressão H2-T23 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |        |        |        |        |        |        |       |        |
|---|--------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| Idade   | E13.5  | E14.5   | E15.5  | E16.5 | E17.5  | E18.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10     | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                           | 0.0735 | 0.0725  | 0.1447 | 0.116 | 0.1535 | 0.133  | 0.1308 | 0.202  | 0.685  | 0.6167 | 0.6743 | 0.638 | 0.8385 |
| Desvio Padrão   | 0.0304 | 0.02616 | 0.0055 | 0.112 | 0.0913 | 0.0651 | 0.0404 | 0.0502 | 0.1828 | 0.1792 | 0.2324 | 0.054 | 0.1934 |
| Erro Padrão   | 0.0215 | 0.0185  | 0.0032 | 0.079 | 0.0456 | 0.046  | 0.0181 | 0.029  | 0.1056 | 0.1035 | 0.1342 | 0.038 | 0.0967 |
| Mediana   | 0.0735 | 0.0725  | 0.142  | 0.116 | 0.1275 | 0.133  | 0.115  | 0.187  | 0.748  | 0.711  | 0.772  | 0.638 | 0.871  |
| N   | 2      | 2       | 3      | 2     | 4      | 2      | 5      | 3      | 3      | 3      | 3      | 2     | 4      |

| FÍGADO - Valores - Perfil de Expressão Aire - C57BL/6 |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |    |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|---|----|----|----|----|
| Idade   | E13.5 | E14.5 | E15.5 | E16.5 | E17.5 | E18.5 | E20.5 | 1 | 5 | 10 | 15 | 45 | 60 |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Desvio Padrão   |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |    |
| Erro Padrão   |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |    |
| Mediana   |       |       |       |       |       |       |       |   |   |    |    |    |    |
| N   | 2     | 2     | 6     | 3     | 5     | 2     | 5     | 3 | 2 | 2  | 2  | 2  | 2  |

| INTESTINO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q7 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |        |        |        |        |        |        |       |        |
|---|--------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| Idade   | E13.5  | E14.5   | E15.5  | E16.5 | E17.5  | E18.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10     | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                             | 0.0515 | 0.034   | 0.0333 | 0.043 | 0.0247 | 0.0185 | 0.028  | 0.0268 | 0.0695 | 0.19   | 0.1905 | 0.631 | 0.9175 |
| Desvio Padrão   | 0.0347 | 0.02404 | 0.004  | 0.031 | 0.011  | 0.0078 | 0.0028 | 0.0178 | 0.0163 | 0.0509 | 0.0035 | 0.343 | 0.1167 |
| Erro Padrão   | 0.0245 | 0.017   | 0.0023 | 0.018 | 0.0064 | 0.0055 | 0.002  | 0.0089 | 0.0115 | 0.036  | 0.0025 | 0.243 | 0.0825 |
| Mediana   | 0.0515 | 0.034   | 0.034  | 0.06  | 0.03   | 0.0185 | 0.028  | 0.023  | 0.0695 | 0.19   | 0.1905 | 0.631 | 0.9175 |
| N   | 2      | 2       | 3      | 3     | 3      | 2      | 2      | 4      | 2      | 2      | 2      | 2     | 2      |

| INTESTINO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q10 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |        |        |        |        |       |        |       |    |
|--|--------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|----|
| Idade  | E13.5  | E14.5   | E15.5  | E16.5 | E17.5  | E18.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10    | 15     | 45    | 60 |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                              | 0.0365 | 0.0365  | 0.1503 | 0.127 | 0.214  | 0.7255 | 0.949  | 0.296  | 0.24   | 0.008 | 0.053  | 0.036 |    |
| Desvio Padrão  | 0.0106 | 0.01485 | 0.0759 | 0.035 | 0.1929 | 0.1011 | 0.0721 | 0.2305 | 0.3069 | 0     | 0.0085 | 0.013 |    |
| Erro Padrão  | 0.0075 | 0.0105  | 0.0438 | 0.02  | 0.0965 | 0.0715 | 0.051  | 0.163  | 0.217  | 0     | 0.006  | 0.009 |    |
| Mediana  | 0.0365 | 0.0365  | 0.172  | 0.134 | 0.121  | 0.7255 | 0.949  | 0.296  | 0.24   | 0.008 | 0.053  | 0.036 |    |
| N  | 2      | 2       | 3      | 3     | 4      | 2      | 2      | 2      | 2      | 2     | 2      | 2     | 1  |

| INTESTINO - Valores - Perfil de Expressão H2-T23 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |        |        |        |        |        |        |       |        |
|--|--------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| Idade  | E13.5  | E14.5   | E15.5  | E16.5 | E17.5  | E18.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10     | 15     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                              | 0.008  | 0.0045  | 0.0203 | 0.016 | 0.0297 | 0.0355 | 0.066  | 0.1137 | 0.1997 | 0.458  | 0.5445 | 0.381 | 0.699  |
| Desvio Padrão  | 0.0042 | 0.00212 | 0.0112 | 0.005 | 0.0254 | 0.0233 | 0.0346 | 0.0397 | 0.0792 | 0.1683 | 0.0941 | 0.203 | 0.4257 |
| Erro Padrão  | 0.003  | 0.0015  | 0.0065 | 0.003 | 0.0147 | 0.0165 | 0.02   | 0.0229 | 0.0457 | 0.119  | 0.0665 | 0.144 | 0.301  |
| Mediana  | 0.008  | 0.0045  | 0.023  | 0.013 | 0.016  | 0.0355 | 0.063  | 0.097  | 0.212  | 0.458  | 0.5445 | 0.381 | 0.699  |
| N  | 2      | 2       | 3      | 3     | 3      | 2      | 3      | 3      | 3      | 2      | 2      | 2     | 2      |

| INTESTINO - Valores - Perfil de Expressão Aire - C57BL/6 |       |         |        |       |        |        |        |        |        |        |        |    |    |
|--|-------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|----|
| Idade  | E13.5 | E14.5   | E15.5  | E16.5 | E17.5  | E18.5  | E20.5  | 1      | 5      | 10     | 15     | 45 | 60 |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                            |       | 0.8557  | 0.2893 | 0.218 | 0.7205 | 0.3527 | 0.376  | 0.3    | 0.2175 | 0.7715 | 0.381  |    |    |
| Desvio Padrão  |       | 0.1317  | 0.0717 | 0.166 | 0.0474 | 0.1151 | 0.0752 | 0.0127 | 0.1464 | 0.1181 | 0.3055 |    |    |
| Erro Padrão  |       | 0.07604 | 0.0414 | 0.117 | 0.0335 | 0.0665 | 0.0434 | 0.009  | 0.1035 | 0.0835 | 0.216  |    |    |
| Mediana  |       | 0.825   | 0.269  | 0.218 | 0.7205 | 0.358  | 0.403  | 0.3    | 0.2175 | 0.7715 | 0.381  |    |    |
| N  | 1     | 3       | 3      | 2     | 2      | 3      | 3      | 2      | 2      | 2      | 2      | 1  | 1  |

| CÉREBRO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q7 - C57BL/6 |       |        |        |       |       |        |        |        |   |    |    |    |        |
|---|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|---|----|----|----|--------|
| Idade   | E14.5 | E15.5  | E16.5  | E17.5 | E18.5 | E19.5  | E20.5  | 1      | 5 | 10 | 15 | 45 | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                           |       | 0.1823 | 0.1673 | 0.145 |       | 0.1375 | 0.3205 | 0.303  |   |    |    |    | 0.353  |
| Desvio Padrão   |       | 0.176  | 0.0569 | 0.02  |       | 0.0912 | 0.1266 | 0.0325 |   |    |    |    | 0.1853 |
| Erro Padrão   |       | 0.1016 | 0.0328 | 0.011 |       | 0.0645 | 0.0895 | 0.023  |   |    |    |    | 0.131  |
| Mediana   |       | 0.11   | 0.184  | 0.152 |       | 0.1375 | 0.3205 | 0.303  |   |    |    |    |        |
| N   | 1     | 3      | 3      | 3     | 1     | 2      | 2      | 2      | 1 | 1  | 1  | 1  | 2      |

| CÉREBRO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q10 - C57BL/6 |       |         |        |       |       |        |        |        |   |    |    |    |        |
|--|-------|---------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|---|----|----|----|--------|
| Idade  | E14.5 | E15.5   | E16.5  | E17.5 | E18.5 | E19.5  | E20.5  | 1      | 5 | 10 | 15 | 45 | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                            |       | 0.033   | 0.017  |       |       | 0.0535 | 0.6965 | 0.0855 |   |    |    |    | 0.1165 |
| Desvio Padrão  |       | 0.02982 | 0.0014 |       |       | 0.0417 | 0.4292 | 0.0997 |   |    |    |    | 0.128  |
| Erro Padrão  |       | 0.01721 | 0.001  |       |       | 0.0295 | 0.3035 | 0.0705 |   |    |    |    | 0.0905 |
| Mediana  |       | 0.025   | 0.017  |       |       | 0.0535 | 0.6965 | 0.0855 |   |    |    |    | 0.1165 |
| N  | 1     | 3       | 2      | 1     | 1     | 2      | 2      | 2      | 1 | 1  | 1  | 1  | 2      |

| CÉREBRO- Valores - Perfil de Expressão H2-T23 - C57BL/6 |       |         |       |       |       |        |        |        |   |    |    |    |        |
|---|-------|---------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---|----|----|----|--------|
| Idade   | E14.5 | E15.5   | E16.5 | E17.5 | E18.5 | E19.5  | E20.5  | 1      | 5 | 10 | 15 | 45 | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                           |       | 0.023   |       |       |       | 0.012  | 0.014  | 0.088  |   |    |    |    | 0.04   |
| Desvio Padrão   |       | 0.01414 |       |       |       | 0.0014 | 0.0071 | 0.0948 |   |    |    |    | 0.0509 |
| Erro Padrão   |       | 0.01    |       |       |       | 0.001  | 0.005  | 0.067  |   |    |    |    | 0.036  |
| Mediana   |       | 0.023   |       |       |       | 0.012  | 0.014  | 0.088  |   |    |    |    | 0.04   |
| N   | 1     | 2       | 1     | 1     | 1     | 2      | 2      | 2      | 1 | 1  | 1  | 1  | 2      |

| CÉREBRO- Valores - Perfil de Expressão Aire - C57BL/6 |       |        |        |       |       |        |        |        |       |    |    |    |        |
|---|-------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|----|----|----|--------|
| Idade   | E14.5 | E15.5  | E16.5  | E17.5 | E18.5 | E19.5  | E20.5  | 1      | 5     | 10 | 15 | 45 | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                         |       | 0.763  | 0.3703 | 0.237 |       | 0.328  | 0.6355 | 0.4105 | 0.194 |    |    |    | 0.1355 |
| Desvio Padrão   |       | 0.3396 | 0.2657 | 0.107 |       | 0.0636 | 0.0997 | 0.4278 | 0.157 |    |    |    | 0.0233 |
| Erro Padrão   |       | 0.196  | 0.1534 | 0.062 |       | 0.045  | 0.0705 | 0.3025 | 0.111 |    |    |    | 0.0165 |
| Mediana   |       | 0.915  | 0.436  | 0.215 |       | 0.328  | 0.6355 | 0.4105 | 0.194 |    |    |    | 0.1355 |
| N   | 1     | 3      | 3      | 3     | 1     | 2      | 2      | 2      | 2     | 1  | 1  | 1  | 2      |

| BAÇO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q7 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |
|--|--------|---------|--------|-------|--------|
| Idade  | 1      | 5       | 10     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                        | 0.0165 | 0.0085  | 0.0343 | 0.167 | 0.7665 |
| Desvio Padrão  | 0.0049 | 0.00173 | 0.0107 | 0.038 | 0.1737 |
| Erro Padrão  | 0.0025 | 0.00087 | 0.0062 | 0.022 | 0.0869 |
| Mediana  | 0.016  | 0.008   | 0.032  | 0.163 | 0.743  |
| N  | 4      | 4       | 3      | 3     | 4      |

| BAÇO - Valores - Perfil de Expressão H2-T23 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |
|---|--------|---------|--------|-------|--------|
| Idade   | 1      | 5       | 10     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                         | 0.1047 | 0.0965  | 0.2217 | 0.582 | 0.5973 |
| Desvio Padrão   | 0.006  | 0.00332 | 0.0383 | 0.333 | 0.3969 |
| Erro Padrão   | 0.0035 | 0.00166 | 0.0221 | 0.193 | 0.1985 |
| Mediana   | 0.104  | 0.0955  | 0.227  | 0.491 | 0.643  |
| N   | 3      | 4       | 3      | 3     | 4      |

| BAÇO - Valores - Perfil de Expressão H2-Q10 - C57BL/6 |        |         |        |       |        |
|---|--------|---------|--------|-------|--------|
| Idade   | 1      | 5       | 10     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                         | 0.2103 | 0.019   | 0.0127 | 0.053 | 0.0553 |
| Desvio Padrão   | 0.0332 | 0.001   | 0.004  | 0.003 | 0.0049 |
| Erro Padrão   | 0.0192 | 0.00058 | 0.0023 | 0.002 | 0.0028 |
| Mediana   | 0.218  | 0.019   | 0.012  | 0.054 | 0.053  |
| N   | 3      | 3       | 3      | 3     | 3      |

| BAÇO - Valores - Perfil de Expressão Aire - C57BL/6 |        |         |        |       |        |
|---|--------|---------|--------|-------|--------|
| Idade   | 1      | 5       | 10     | 45    | 60     |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                       | 0.0295 | 0.08367 | 0.0127 | 0.081 | 0.2073 |
| Desvio Padrão                                       | 0.0163 | 0.01901 | 0.0021 | 0.016 | 0.0456 |
| Erro Padrão   | 0.0115 | 0.01097 | 0.0012 | 0.009 | 0.0263 |
| Mediana   | 0.0295 | 0.083   | 0.012  | 0.077 | 0.223  |
| N   | 2      | 3       | 3      | 3     | 3      |

| PLACENTA - Valores - Perfil de Expressão H2-Q7 - C57BL/6 |        |         |        |       |
|--|--------|---------|--------|-------|
| Idade  | E13.5  | E15.5   | E16.5  | E20.5 |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                            | 0.0327 | 0.045   | 0.0413 | 0.023 |
| Desvio Padrão  | 0.0085 | 0.01778 | 0.0146 | 0.01  |
| Erro Padrão  | 0.0049 | 0.01026 | 0.0085 | 0.006 |
| Mediana  | 0.036  | 0.039   | 0.039  | 0.024 |
| N  | 3      | 3       | 3      | 3     |

| PLACENTA - Valores - Perfil de Expressão H2-T23 - C57BL/6 |        |        |        |       |
|---|--------|--------|--------|-------|
| Idade   | E13.5  | E15.5  | E16.5  | E20.5 |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                             | 0.2435 | 0.6507 | 0.3227 | 0.28  |
| Desvio Padrão   | 0.0134 | 0.4081 | 0.0174 | 0.044 |
| Erro Padrão   | 0.0095 | 0.2356 | 0.01   | 0.025 |
| Mediana   | 0.2435 | 0.852  | 0.329  | 0.294 |
| N   | 2      | 3      | 3      | 3     |

| PLACENTA - Valores - Perfil de Expressão H2-Q10 - C57BL/6 |        |        |        |       |
|---|--------|--------|--------|-------|
| Idade   | E13.5  | E15.5  | E16.5  | E20.5 |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                             | 0.7957 | 0.2425 | 0.249  | 0.043 |
| Desvio Padrão   | 0.3059 | 0.0502 | 0.073  | 0.007 |
| Erro Padrão   | 0.1766 | 0.0355 | 0.0422 | 0.005 |
| Mediana   | 0.943  | 0.2425 | 0.263  | 0.043 |
| N   | 3      | 2      | 3      | 2     |

| PLACENTA - Valores - Perfil de Expressão Aire - C57BL/6 |        |         |        |       |
|---|--------|---------|--------|-------|
| Idade   | E13.5  | E15.5   | E16.5  | E20.5 |
| Média (2- $\Delta\Delta Ct$ )                           | 0.021  | 0.05967 | 0.0693 | 0.877 |
| Desvio Padrão   | 0.0062 | 0.01762 | 0.0402 | 0.151 |
| Erro Padrão   | 0.0036 | 0.01017 | 0.0232 | 0.087 |
| Mediana   | 0.019  | 0.065   | 0.061  | 0.922 |
| N   | 3      | 3       | 3      | 3     |

ANEXOS

**ANEXO A – Certificado de aprovação do Comitê de ética em experimentação animal.**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 043/2009, sobre o projeto intitulado “*Expressão do Qa-2 e Qa-1, homólogos murinos funcionais do HLA-G e HLA-E durante a ontogenia do timo e de outros órgãos em camundongo C57/BL6*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Antonio Donadi** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **27 de abril de 2009**.

(We certify that the protocol nº 043/2009, about “*Expression of Qa-2 and Qa-1, the murine functional homologs of HLA-G and HLA-E during ontogeny of thymus and others organs in mice C57/BL6*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in **04/27/2009** meeting.

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2009.

  
**Prof. Dr. Márcio Dantas**  
Vice-Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

**ANEXO B** - Informações adicionais sobre os sondas do *Taqman Inventoried Assays*, *Taqman®Gene Expression Assays*<sup>a</sup> utilizados para análise da expressão gênica.

| Gene Symbol | RefSeq      | Gene Name                                       | Assay ID <sup>b</sup> |
|-------------|-------------|---|-----------------------|
| H2-Q7       | NM_010394.3 | <i>histocompatibility 2, Q region locus 7</i>   | Mm00843895_m1         |
| H2-Q10      | NM_010391.4 | <i>histocompatibility 2, Q region locus 10</i>  | Mm01275264_m1         |
| H2-T23      | NM_010398.3 | <i>histocompatibility 2, T region locus 23</i>  | Mm00439246_m1         |
| Aire        | NM_009646.1 | <i>Autoimmune regulator</i>                     | Mm00477461_m1         |
| Gene Symbol | Probe       | Foward Primer                                   | Amplicon Size         |
| H2-Q7       | FAM/MGB     | TGACCTTGGAGCTGTGGCCATCATT                       | 91                    |
| H2-Q10      | FAM/MGB     | GACCCAGGCAGGCTCACACTCCATG                       | 65                    |
| H2-T23      | FAM/MGB     | TATGCTCATGTTCTAGGCAGCAAGA                       | 65                    |
| Aire        | FAM/MGB     | CTTGCCAAGGTAGGGGACGACTCTG                       | 89                    |
| Gene Symbol | RefSeq      | Gene Name                                       | Part Number           |
| GAPDH       | NM_008084.2 | <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> | 4352339E              |
| ACTB        | NM_007393.1 | <i>Beta - Actin</i>                             | 4352341E              |
| Gene Symbol | Probe       | Foward Primer                                   | Amplicon Size         |
| GAPDH       | VIC/MGB     | CCAAGGTCATCCATGACAAC                            | 107                   |
| ACTB        | VIC/MGB     | GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT                            | 115                   |

(a - Ensaios pré-formulados de Real-Time PCR previamente fabricados e imediatamente avaliados no momento do pedido. A eficiência de amplificação dos primers é assegurada como igual a 1, permitindo a aplicação do método do  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . b - A terminação \_m representam sondas que expandem através de junções éxon-éxon e não amplificam DNA genômico.)



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)