



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA – CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGB

JOSÉ RENATO DE SOUSA PASSOS

**EXPRESSÃO DO SISTEMA INTERLEUCINA 1 (IL-1) EM FOLÍCULOS
OVARIANOS BOVINOS E EFEITOS *IN VITRO* DA IL-1 β NA ATIVAÇÃO DE
FOLÍCULOS PRIMORDIAIS**

SOBRAL – CEARÁ

2015

JOSÉ RENATO DE SOUSA PASSOS

**EXPRESSÃO DO SISTEMA INTERLEUCINA 1 (IL-1) EM FOLÍCULOS
OVARIANOS BOVINOS E EFEITOS *IN VITRO* DA IL-1 β NA ATIVAÇÃO DE
FOLÍCULOS PRIMORDIAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Macromoléculas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL – CEARÁ

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- P323e Passos, José Renato de Sousa.
 Expressão do Sistema Interleucina 1 (IL-1) em folículos ovarianos bovinos e efeitos *in vitro* da IL-1 β na ativação de folículos primordiais. / José Renato de Sousa Passos. – 2015.
 104 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.
 Área de Concentração: Macromoléculas.
 Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.
 Coorientação: Profa. Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva.
1. Expressão gênica. 2. Folículo ovariano. I. Título.

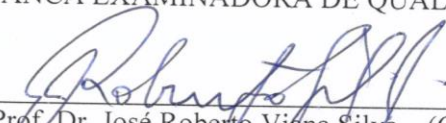
JOSÉ RENATO DE SOUSA PASSOS

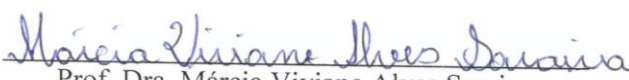
EXPRESSÃO DO SISTEMA INTERLEUCINA 1 (IL-1) EM FOLÍCULOS
OVARIANOS BOVINOS E EFEITOS *IN VITRO* DA IL-1 β NA ATIVAÇÃO DE
FOLÍCULOS PRIMORDIAIS


Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Macromoléculas.

Aprovado em: 23/03/2015.

BANCA EXAMINADORA DE QUALIFICAÇÃO


Prof. Dr. José Roberto Viana Silva – (Orientador)
(Universidade Federal do Ceará – UFC)


Prof. Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva
(Universidade Federal do Ceará – UFC)


Prof. Dr. João Garcia Alves Filho
(Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA)

Ao meu Deus, guia em todos os meus caminhos, presente na inspiração e conhecimento adquiridos, sem o qual nenhum pensamento, palavra ou frase se concretizaria.

Aos meus Pais, Joaquim e Celeste, e aos meus irmãos pela força, incentivo, orientação, carinho, amor... Por estarem comigo em todas as etapas da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Supremo Deus acima de todas as coisas, pelo dom da vida, por seu exímio cuidado, pela oportunidade de poder aprender, por me fazer vencer todas as adversidades e ter permitido que este sonho nascesse e fosse adiante, sendo assim concretizado. E, principalmente, por ter sido meu baluarte na busca de soluções para o que parecia impossível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a concretização de minhas atividades de pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFC, pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pelo acolhimento no grupo de pesquisa, pelo exemplo de profissional, pelos ensinamentos repassados, pelo apoio no direcionamento dos experimentos, bem como pela motivação e confiança depositadas, meus sinceros agradecimentos pela orientação.

Agradeço à querida Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva, pela contribuição dada a minha formação profissional durante o período de mestrado, pela admiração que tenho por sua dedicação à ciência, pelos conhecimentos transmitidos, confiança, amizade e ética.

Aos Professores Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, Dr. João Garcia Alves Filho e Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner, muito obrigado pelas orientações, ensinamentos e contribuições.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFC, pelos ensinamentos ministrados durante o curso.

Aos Professores Dr. Paulo Bayard, Dr. Fábio Comim e Dr. Alfredo Antoniazzi, por me receberem no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) – UFSM de

portas abertas e sempre estarem à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Realmente, deu certo, e vocês representam uma parte essencial deste trabalho.

Aos meus pais, Joaquim Passos e Celeste Passos, minha imensurável gratidão. Sempre acreditaram em mim e na minha capacidade, abrindo mão de seus sonhos para que eu pudesse concretizar os meus. Isso só me fortaleceu, fazendo-me sempre tentar, não a ser o melhor, mas a dar o melhor de mim. Muito obrigado pelo amor incondicional!

Aos meus irmãos, Luciano Passos, Roberta Passos, George Passos e Fábio Passos, e aos meus sobrinhos Maria Luciana Passos e Yuri Passos, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre tiveram orgulho de mim, confiaram e acreditaram em meu trabalho. Obrigado pela confiança!

Aos meus tios, tias, primos e primas, especialmente à prima Juliane Passos, por me incentivar a voltar à pesquisa, lugar em que hoje me sinto muito realizado. Obrigado pela força!

Agradeço também às minhas cunhadas Ana Cristina Passos e Susy Passos, pelo incentivo e apoio. Obrigado pelo carinho!

A minha amiga Regislane Ribeiro, pela amizade, dedicação, ensinamentos e auxílio. Muito obrigado, pois nesses anos, encontrei uma amiga e uma pessoa disposta a me ajudar de forma significativa!

Ao casal de amigos Jackson Costa e Amélia Soares, que estiveram ao meu lado durante esses anos (incluindo finais de semana), e não mediram esforços para me ajudar, incentivar, sempre com uma solução simples para os desafios que pareciam ser gigantes. Obrigado por tudo!

Aos amigos Anderson Weiny, Tânia Lopes, Glaucinete Borges e Ellen Vasconcelos que com ajuda de vocês se tornou mais fácil enfrentar as adversidades, pois sempre que precisei vocês me ajudaram, me apoiaram, acreditaram que eu iria conseguir, e juntos tivemos

muitos momentos de risos e isso me faz muito bem. Obrigado pela rica troca de conhecimentos e cumplicidade. Vamos com tudo, rumo ao cume mais alto, sempre.

A toda equipe do grupo de pesquisa em Biotecnologia da Reprodução e Cultura de Células e Tecidos (UFC), Taiã Gomes, Joyla Bernardo, Pedro Alves, Rithiele Dantas, Kelry Lopes, Adriel Castro e Laís Melo. Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementando e nos fortalecendo.

Aos que contribuíram de forma significativa no grupo de pesquisa de Biotecnologia da Reprodução e Cultura de Células e Tecidos (UFC), e que hoje trilharam seus caminhos: Rodrigo Rossi, Emanuela Rebouças, Cíntia Camurça, Juliane Passos, Gisvani Lopes, Moemia Portela e Katianne Freitas, pelo companheirismo em todos os momentos vividos, ensinamentos repassados e dúvidas tiradas.

Aos meus queridos amigos do Pequeno Grupo (PG) da Ibava, Alexandre Xavier, Cainan Camilo, Joel Mourão, Roberto Rebouças, Matheus Barbalho, pelo companheirismo e pelo apoio irrestrito, pessoas essas que sempre posso contar. Tenho muita estima por cada um de vocês. Obrigado por fazerem parte da minha vida!

Aos meus amigos de perto e de longe, aos antigos e mais recentes, aqueles a quem vejo todos os dias e aqueles que raramente encontro, Abraão Secundino, Aline Lopes, Elyésio Paz, Isabel Sena, Anistela Lopes, Danielle Val, Douglas Fontenele, Iolita Sousa, Renata Lira, Reginaldo Silvestre, Rejane Valéria, bem como a amiga Leonília Ferreira "*In memoriam*", que sempre torceu por mim, e acreditava que tudo daria certo. Meus sinceros agradecimentos!

Aos colegas de mestrado, Annyta Frota, Aurilene Cajado, Chrisleny Nobre, Cirlânio Albuquerque, Iara Araújo, Iran Veras, Isabela Pinto, Jedson Aragão, Louricélia Rodrigues, Marianne Pontes, Mônica Brito, Rafaele Aragão, Raul Freitas, Rúlio Rocha, Vitória Soares, Wandy Policarpo, pelos laços de amizade firmados durante o período do curso.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução – BioRep – UFSM, Matheus De Cesaro e Andressa Dau, por me receberem tão bem, me ajudarem, e pelo apoio excepcional na participação deste trabalho. Acredito que durante esse período, laços fraternos foram firmados, pois estiveram comigo mais de perto, sempre solícitos... Independente de

todas as adversidades enfrentadas, sempre tinha uma solução brilhante diante do turbilhão de dúvidas que me assolava. A participação de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. Meu muito obrigado!

Aos demais colegas do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução – BioRep – UFSM, Joabel Tonello, Janduí da Nóbrega, Monique Tomazele, Juliana Ferst, Vítor Rissi, Gustavo Ilha, Paulo Antunes, Werner Glanzner, Alfredo César, Lady Katerine Mujica e a todos os alunos da Iniciação Científica, pelo aprendizado, acolhida e atenção dispensada a mim durante todo o período que convivi com vocês em Santa Maria – RS.

Aos amigos e colegas que fiz no período em que estive na cidade de Santa Maria – RS: Samuel Barreto, André Dias, Jauden Xavier, Samantha Greff, Susana Fischer, Karen Sena, Christoffer Schwertner, Paula Purper, Marco Aurélio Steffani e Ramon Zarpellon. Mesmo na correria diária, estavam sempre preocupados comigo e com os resultados dos experimentos, sempre dando-me forças para seguir em frente. Muito obrigado por me acolherem como amigo!

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, em especial ao Sr. Almino Conrado, Edilda Ponte, Cristina Fontenele, Gade Sousa, Regina Gláucia Ripardo, Neto Gadelha, Keila Gadelha, Ismael Peres e Diná Sousa, pelos muitos auxílios prestados a mim.

Aos animais, parte fundamental deste trabalho, obrigado por suas contribuições à ciência.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!

“Ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; as ovelhas sejam arrebatadas do aprisco, e nos currais não haja gado, todavia, eu me alegro no SENHOR, exulto no Deus da minha salvação.”

(Habacuque 3:17-18)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a expressão do sistema interleucina 1 (proteínas e RNAm de ligantes e receptores) e sua distribuição nos ovários de vacas cíclicas, bem como avaliar os efeitos da IL-1 β na sobrevivência e ativação de folículos primordiais *in vitro*. Os ovários foram processados para a localização do sistema interleucina 1 em folículos pré-antrais e antrais utilizando as técnicas de imunohistoquímica, qPCR e análise de Western blot. Para os estudos *in vitro*, fragmentos ovarianos foram cultivados em α -MEM⁺ suplementado com IL-1 β (0, 1, 10, 50 ou 100 ng/mL), e após 6 dias foram processados para análise histológica. Os resultados de imunohistoquímica mostraram que a proteína para os integrantes do sistema interleucina I (IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII) foram detectados em diferentes compartimentos foliculares. Infelizmente, o anticorpo testado para localização de IL-1 α não reagiu em ovários bovinos. Todas as proteínas testadas foram observados no citoplasma dos oócitos e nas células da granulosa de todas as categorias foliculares, e nas células da teca de folículos antrais, com a exceção da IL-1 α , que não foi encontrada em nenhuma das células analisadas. Foram observados níveis variáveis de RNAm para o sistema interleucina 1 nas diferentes categorias foliculares analisadas. Após 6 dias de cultivo, a presença de IL-1 β (10 ou 50 ng/mL) foi capaz de manter a percentagem de folículos normais e de promover a ativação dos folículos primordiais. Em conclusão, os componentes do sistema de interleucina 1 são expressos diferencialmente em células ovarianas de acordo com a fase do desenvolvimento folicular. Além disso, a IL-1 β promove o desenvolvimento de folículos primordiais *in vitro*. Estes resultados sugerem um importante papel do sistema interleucina 1 na regulação da foliculogênese em bovinos.

Palavras-chave: bovino, sistema interleucina 1, expressão gênica, folículos primordiais

Abstract

This study aims to investigate the expression of interleukin 1 system (proteins and mRNA of ligands and receptors) and its distribution in ovaries of cyclic cows, as well as to evaluate the effects of IL-1 β on the survival and activation of primordial follicles *in vitro*. The ovaries were processed for localization of interleukin 1 system in preantral and antral follicles by immunohistochemical, qPCR and western blot analysis. For *in vitro* studies, ovarian fragments were cultured in α -MEM⁺ supplemented with IL-1 β (0, 1, 10, 50 or 100 ng/mL), and after 6 days the tissues cultured were processed for histological analysis. Immunohistochemical results showed that the proteins for interleukin 1 system (IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII) were detected in the various follicular compartments. Unfortunately, IL-1 α antibodies tested did not react in bovine ovaries. All the proteins tested were observed in the cytoplasm of oocytes and granulosa cells from all follicular categories, and theca cells of antral follicles, with the exception that IL-1 α has not been found in any analyzed cell. Variable levels of mRNA for the interleukin 1 system in the follicular size and classes analysed. After 6 days of culture, the presence of IL-1 β (10 or 50 ng/mL) was effective in maintaining the percentage of normal follicles and in promoting primordial follicle activation. In conclusion, interleukin 1 system is differentially expressed in the ovarian cells according to the stage of follicular development. Moreover, IL-1 β promotes the development of primordial follicles. These results suggest an important role of the interleukin 1 system in the regulation of folliculogenesis in bovine species.

Keywords: bovine, interleukin 1 system, gene expression, primordial follicles

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.	Via de sinalização da interleucina 1 (IL-1) mostrando as moléculas que estão envolvidas na cascata de sinalização. Interleucina 1 (IL-1), receptor de interleucina 1 (IL-1RI), receptor acessório da proteína da interleucina 1 (IL-1RAcP), proteína de diferenciação mieloide (MyD88), quinases associadas ao receptor de interleucina 1 (IRAKs), fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), proteína quinase NF-kB indutoras de quinase (NIK), NF-kB inibidor de proteínas (I-kB), fator de transcrição nuclear (NF-kB)	33
------------------	--	----

ARTIGO I

FIGURE 1.	IL-1 β and IL-1RA immunoreactivity in different follicular categories. (A) Primordial follicle, (B) primary follicle, (C) secondary follicle, (D) small antral follicle, (E) COC of a large antral follicle, (F) mural granulosa and theca cells from a large antral follicle, (G) negative control reaction. O: oocyte; G: granulosa cells; MGC: mural granulosa cells; CC: cumulus cells; T: theca cells. Scale bars represent 10 and 40 μ m	66
FIGURE 2.	Interlukin 1-RI and IL-1RII immunoreactivity in different follicular categories. (A) Primordial follicle, (B) primary follicle, (C) secondary follicle, (D) small antral follicle, (E) COC of a large antral follicle, (F) mural granulosa and theca cells from a large antral follicle, (G) negative control reaction. O: oocyte; G: granulosa cells; MGC: mural granulosa cells; CC: cumulus cells; T: theca cells. Scale bars represent 10 and 40 μ m	67
FIGURE 3.	Protein expression for interleukin I system: IL-1 β and its precursor Pro-IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI, IL-1RII determined by Western blotting. Total protein levels were normalized to the loading control β -actin	68
FIGURE 4.	Relative expression of mRNA for interleukin I system in bovine preantral and small antral follicle (<3mm). SEC– secondary follicle; OO – oocyte; CC – cumulus cells; FW – follicular wall. Significantly different (P<0.05)	69
FIGURE 5.	Relative expression of mRNA for interleukin I system, in bovine small antral follicle. OO – oocyte; CC – cumulus cells; FW – follicular wall. Significantly different (P<0.05)	70
FIGURE 6.	Relative expression of mRNA for interleukin I system in bovine large antral follicle. OO – oocyte; CC – <i>cumulus</i> cells; FW – follicular wall. Significantly different (P<0.05)	71

FIGURE 7.	Relative expression of mRNA for interleukin I system in small (<3mm) and large antral follicle (>3mm). OO – oocyte; CC – <i>cumulus</i> cells; FW – follicular wall. Significantly different (P<0.05)	72
FIGURE 8.	Histological section of non-cultured tissue after staining with hematoxylin and eosin (H&E), showing a normal follicle (A) and a degenerated follicle (B). O, oocyte; Nu, nucleus; GC, granulosa cells (original magnification ×400)	73
FIGURE 9	Percentage (mean ± SEM) of morphologically normal follicles in non-cultured control tissue (day 0), and in tissue cultured for 6 days in medium containing IL-1β. *Differs significantly from fresh control follicles. A,B Differences of all the treatments with IL[100] (P<0.05)	73
FIGURE 10	Percentage (mean ± SEM) of primordial follicles in non-cultured tissues and in tissues cultured for 6 days in medium containing IL-1β. *Differs significantly from control; Capital letters represent significant differences among cultivated treatments (P<0.05)	74
FIGURE 11	Percentage (mean ± SEM) of developing follicles in non-cultured tissues and in tissues cultured for 6 days in medium containing IL-1β. *Differs significantly from control non-cultured follicles; Capital letters represent significant differences among cultivated treatments (P<0.05)	74

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

- Table 1.** Oligonucleotide primers used for PCR analysis of bovine cells and tissues 64
- Table 2.** Relative intensity of immunohistochemical staining for IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII, and localization of mRNA for IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII in the ovaries of cows. 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM17	Metalopeptidase domínio 17
17 α OH	17 α -hidroxilase
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
Akt	Proteína kinase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AREG	Ampirregulina
BMP-7	Proteína morfogenética óssea 7
BSA	Albumina sérica bovina
BTC	β -celulina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Con A	Concanavalina A
COC	Complexo cumulus-oócito
COX	Ciclooxygenase
COX-1	Ciclooxygenase tipo 1
COX-2	Ciclooxygenase tipo 2
CREB	Proteína ligante do elemento de resposta ao AMP cíclico
Ct	Cycle threshold (Ciclo de threshold)
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
EREG	Epirregulina

ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERK1	Quinase regulada por sinal extracelular do tipo 1
ERK2	Quinase regulada por sinal extracelular do tipo 1
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico básico 2
FGF-10	Fator de crescimento fibroblástico básico 10
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOXO3	Fator de Transcrição Forkhead 3
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Gauge
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação 9
GDNF	Fator neurotrófico derivado da linhagem celular glial
GH	Hormônio do Crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
I-kB	NF-kB inibidoras de proteínas
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-1RA	Antagonista do receptor de IL-1
IL-1RAcP	Receptor acessório da proteína da interleucina 1
IL-1RI	Receptor de interleucina do tipo I
IL-1RII	Receptor de interleucina do tipo II
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

IRAK	Quinase associada ao receptor de interleucina
IRAK 1	Quinase do tipo 1 associada ao receptor de interleucina
IRAK 2	Quinase do tipo 2 associada ao receptor de interleucina
kDa	Kilodaltons
KL	Kit ligante
KGF	Fator de crescimento de queratinócito
LH	Hormônio Luteinizante
LHR	Receptor do Hormônio Luteinizante
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MyD88	Proteína de diferenciação mieloide
NF-kB	Fator de transcrição nuclear
Ng	Nanograma
NGF	Fator de crescimento neural
NIK	Proteína quinase NF-kB indutora de quinase
Nm	Nanômetro
Ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico
p27	Inibidor de kinase dependente de ciclina
P4	Progesterona
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 alfa
pH	Potencial hidrogeniônico

PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PTEN	Fosfatase e tensina homóloga com deleção no cromossomo 10
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAse	Ribonuclease
S1P	Esfingosina 1-fosfato
TACE	Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (Enzima conversora do fator de necrose tumoral α)
TGF- β	Fatores de crescimento transformante beta
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
α -MEM	Meio essencial mínimo alfa
α -MEM ⁺	Meio essencial mínimo alfa suplementado

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
± SEM	Standard error of the mean (Erro padrão da média)
≥	Maior ou igual a
≤	Menor ou igual a
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
M	Molar
NaCl	Cloreto de sódio
p < 0,05	Probabilidade de erro menor do que 5%
w/v	Weight/volume (massa/volume)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Ovário mamífero	25
2.2	Foliculogênese	25
2.2.1	<i>Crescimento folicular na fase pré-antral</i>	26
2.2.2	<i>Crescimento folicular na fase antral (terciário e pré-ovulatório)</i>	28
2.2.3	<i>Atresia folicular</i>	30
2.3	Importância das gonadotrofinas para a foliculogênese	31
2.4	As citocinas e as suas funções na foliculogênese	32
2.5	Ovulação	33
2.6	Interleucinas e seus efeitos na ovulação.....	36
3	JUSTIFICATIVA	38
4	HIPÓTESE	39
5	OBJETIVOS	40
5.1	Objetivos gerais.....	40
5.2	Objetivos específicos.....	40
6	<i>ARTIGO I: Protein and mRNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin -1β on primordial follicle activation and survival in vitro</i>	41
7	CONCLUSÕES GERAIS	63
8	PERSPECTIVAS	64
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui atualmente um efetivo bovino de aproximadamente 193,4 milhões de animais, sendo assim o maior rebanho comercial bovino do mundo (ANUALPEC, 2013), perdendo somente para a Índia, onde os bovinos não são utilizados para fins comerciais, por questões religiosas. De acordo com Serapião (2008), a utilização de novas técnicas de produção, incluindo assim diversas biotecnologias que estão ligadas à reprodução animal, tem contribuído para que o Brasil seja o maior exportador mundial de carne bovina. Quanto mais intensificada for a produção através da utilização de biotecnologias da reprodução como a sincronização de estro, inseminação artificial, fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões, melhores serão os resultados de uma boa eficiência produtiva (NEVES *et al.*, 2002). Nesse contexto, o país destaca-se como primeiro país do mundo em número de embriões produzidos *in vitro* (PAVÃO, 2009).

O desafio dos pesquisadores da área de reprodução animal é aumentar, de forma progressiva, a eficiência da produção de embriões a partir de fêmeas de alta produtividade. Para isto, torna-se necessário compreender a fisiologia ovariana em bovinos e desenvolver sistemas de cultivo *in vitro* que possibilitem avaliar os efeitos de diversas substâncias que estão envolvidas com o controle da foliculogênese. Os estudos *in vitro* são de grande importância, pois apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante as duas últimas décadas, o entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular e maturação oocitária ainda não foram alcançados.

Inúmeros fatores de crescimento atuam modulando o efeito dos hormônios e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos. Dentre as proteínas que podem atuar no ovário, pode-se destacar as citocinas inflamatórias, tais como a interleucina 1 β (IL-1 β) que desempenha importante papel tanto na ovulação como na função folicular (VAN DER HOEK, 1998). Nos últimos anos, tornou-se evidente que as citocinas são importantes reguladores intraovarianos, agindo por sua vez de forma benéfica no ovário mamífero. Um conceito emergente é que as citocinas são fundamentais na regulação da foliculogênese, ovulação, e na função do corpo lúteo. Assim, o sistema IL-1 tem efeitos importantes sobre alterações funcionais e estruturais no ovário em todas as fases do ciclo ovariano.

Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados ao ovário mamífero, a foliculogênese, a importância das gonadotrofinas para a foliculogênese, as citocinas e suas funções na foliculogênese, a ovulação, e as interleucinas e seus efeitos na ovulação. Além disso, serão discutidos o papel

das gonadotrofinas para a foliculogênese e ovulação, bem como a importância das citocinas para a foliculogênese e ovulação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovário mamífero

O ovário mamífero é responsável pelo desenvolvimento, maturação e liberação de oócitos maduros para fertilização, bem como pela síntese e secreção de hormônios, que são essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclo estral e manutenção do trato reprodutivo. Em cada ciclo ovariano, muitos folículos são ativados para entrar na fase de crescimento, que é caracterizado tanto pela proliferação das células da granulosa como para o aumento do tamanho do oócito (GOUGEON, 2003).

Ao nascimento, o ovário possui um enorme *pool* de folículos, no qual apenas um número reduzido será utilizado durante toda a vida reprodutiva das fêmeas. A população folicular total existente no ovário compreende uma enorme reserva de folículos primordiais quiescentes, quando comparado a um número inferior de folículos que estão se desenvolvendo (CAHILL & MAULÉON, 1981). Vale ressaltar que apenas parte destes folículos irão se desenvolver até o estágio de folículo pré-ovulatório, cerca de 0,01% (LIU *et al.*, 2002). Essa significativa reserva de material contribuirá para estudos posteriores, como a manipulação genética de espécies domésticas, visando à preservação de espécies em extinção e o tratamento de algumas formas de infertilidade (PICTON, 2001). A fertilidade das fêmeas é determinada em grande parte pela capacidade de desenvolvimento dos oócitos, refletindo assim, na sua capacidade de sofrer meiose, ser fertilizado e dar origem a um embrião saudável (KIDDER, 2010).

2.2 Foliculogênese

A foliculogênese é o processo pelo qual os folículos crescem, amadurecem e eventualmente são eleitos para ovulação. O número de folículos ovarianos que geralmente chega ao estágio ovulatório é muito pequeno, estimando-se que aproximadamente 99,9% sofram atresia (WEBB *et al.*, 1999). A foliculogênese também pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o folículo maduro ou pré-ovulatório. Esse processo é contínuo, com saída diária de folículos do *pool* de reserva, os quais crescem em direção à ovulação ou atresia (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O folículo ovariano é composto por um oócito circundado por células da granulosa e/ou da teca, e é considerado a unidade estrutural e funcional básica do ovário, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento, sobrevivência e maturação do oócito (CORTVRINDT & SMITZ, 2001). Os folículos ovarianos são formados ainda no período fetal, em bovinos, aproximadamente no 130º dia da gestação (FIGUEIREDO *et al.*, 2002) e estão localizados na região cortical do ovário. Ainda, os folículos ovarianos desempenham duas funções independentes, uma endócrina, dada pela produção e liberação de hormônios esteroides e outra exócrina, responsável pelo desenvolvimento do oócito (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados em pré-antrais ou não-cavitários, e ainda antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais são os folículos primordiais, primários e secundários. Já os folículos antrais são os folículos terciários e pré-ovulatórios (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

O folículo primordial é composto de um oócito central que é revestido por células da granulosa de formato pavimentoso. Possivelmente pela iniciação do oócito, essas células começam a crescer e se diferenciam em células da granulosa cuboides para formar um folículo primário. Após serem formados, os folículos primordiais mantêm-se quiescentes até que sejam ativados, ou seja, deixem o estágio inicial e sofram o processo de ativação (FORTUNE, *et al.*, 2000).

2.2.1 Crescimento folicular na fase pré-antral

O desenvolvimento de folículos pré-antrais pode ser dividido em três estágios: ativação de folículos primordiais, transição de folículo primário para secundário e desenvolvimento de folículos secundários até o estágio antral (FORTUNE, 2003). A maioria dos folículos em desenvolvimento sofrerão atresia, porém alguns irão amadurecer até o estágio de folículos pré-ovulatórios.

A população folicular pré-antral já foi estimada nas mais diferentes espécies, perfazendo um total de 285.000 em cada ovário bovino (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011). Além de variações individuais, existem vários fatores que podem afetar o número de folículos que estão nos ovários, tais como: a raça (CAHILL; MAULÉON, 1981; CAHILL; MARIANA; MAULÉON, 1979), a idade (ERICKSON, 1966a; RÜSSE, 1983), os níveis hormonais (PETERS, 1976), a genética (ERICKSON, 1966b), bem como o estado reprodutivo

(ERICKSON; REYNOLDS; MURPHREE, 1976) e nutricional do animal (SCARAMUZZI *et al.*, 1993).

Na ativação folicular, ocorre a saída dos folículos primordiais do seu estado de dormência, seguindo assim o seu crescimento, sendo esta uma etapa importante para a foliculogênese inicial (MARTINS, 2008). Após a ocorrência deste evento, observa-se a transformação das células da pré-granulosa, com formato pavimentoso para formato cuboidal (FORTUNE *et al.*, 2003). A ativação acontece de forma espontânea (FORTUNE, *et al.*, 2000), ou em virtude de estímulos hormonais e fatores de crescimento que são produzidos pelas células da granulosa e oócito, que agem de forma parácrina e autócrina no desenvolvimento dos folículos (ALBERTINI & BARRETT, 2003).

O processo de ativação folicular é regulado por uma via de sinalização denominada de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) – proteína quinase B (Akt) (REDDY *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2007a,b). Por intermédio desta via, muitos fatores de transcrição que agem na sobrevivência dos folículos e no crescimento oocitário são ativados (REDDY *et al.*, 2008). Além disso, a ativação desta via dependerá do balanço entre as moléculas inibitórias e estimulatórias. Como substâncias estimulatórias, pode-se destacar o kit ligante (KL) (JOHN *et al.*, 2009), a insulina (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006), o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (NAGAO *et al.*, 2006), o fator de crescimento de queratinócito (KGF) (CHANG *et al.*, 2005; BAO *et al.*, 2005), o fator de crescimento neural (NGF) (RAHBEK *et al.*, 2005), o fator neurotrófico derivado da linhagem celular glial (GDNF) (SRINIVASAN *et al.*, 2005), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (ABID *et al.*, 2004) e o fator de crescimento do hepatócito (HGF) (TAHER *et al.*, 2002). No que diz respeito às substâncias inibitórias, podem ser citadas a fosfatase e tensina homóloga com deleção no cromossomo 10 (PTEN), a proteína p27 (p27), ou o Fator de Transcrição Forkhead 3 (Foxo3) podem ser destacadas (JOHN *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* com folículos primordiais caprinos têm demonstrado que o controle do início do crescimento folicular é regulado por diversos fatores, como o KL (CELESTINO *et al.*, 2010), estradiol (LIMA-VERDE *et al.*, 2010), a proteína morfogenética óssea 7 (BMP-7) (ARAÚJO *et al.*, 2010), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (BRUNO *et al.*, 2010), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (MARTINS *et al.*, 2010), o VEGF (BRUNO *et al.*, 2009), o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) (MARTINS *et al.*, 2008), a ativina-A (SILVA *et al.*, 2006a), o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) (MATOS *et al.*, 2007), o fator de crescimento epidermal (EGF) (SILVA *et al.*, 2004b), que atuam na promoção da ativação de folículos primordiais e o crescimento oocitário. Em

ovinos, o EGF foi capaz de promover a ativação de folículos primordiais e manteve a viabilidade folicular por até seis dias de cultivo (ANDRADE *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostram a importância de diversas substâncias com ação direta ou indireta na ativação dos folículos ovarianos, como por exemplo: a esfingosina 1-fosfato (S1P), que após 7 dias de cultivo na concentração de 1ng/mL, promoveu a ativação e o desenvolvimento de folículos primordiais caprinos (NÓBREGA Jr. *et al.*, 2014). Além disso, o FGF-10 (FSH/FGF-10 e FSH/FSH) mantêm a viabilidade folicular e ultraestrutural, promovendo a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* por 16 dias (ALMEIDA *et al.*, 2015). Desta forma, acumulam-se evidências de que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais requerem a expressão de vários fatores e receptores. Em particular, a família dos fatores de crescimento transformante beta (TGF- β) tem-se mostrado potente regulador da proliferação e diferenciação celular, nas diferentes espécies (ELVIN *et al.*, 2000). Além desses fatores, existem também comprovações sobre a importância das gonadotrofinas, hormônio do crescimento (GH), esteroides e andrógenos no desenvolvimento de folículos pré-antrais (HARTSHORNE *et al.*, 1994; VENDOLA *et al.*; 1998; BACHELOT *et al.*, 2002; ZACZEK *et al.*, 2002).

Há ainda estudos que utilizam proteínas de origem vegetal, como as lectinas, durante a ativação de folículos primordiais *in vitro*. A lectina jacalina (50 μ g/mL) associada ao FSH (50 μ g/mL) foram capazes de promover a ativação e a sobrevivência de folículos primordiais caprinos em 6 dias de cultivo (RIBEIRO *et al.*, 2014). A lectina concanavalina A (Con A) (10 ou 40 μ g/mL) e o FSH promoveram a ativação de folículos primordiais na espécie caprina, após 6 dias de cultivo (PORTELA *et al.*, 2014).

Por mecanismos independentes de gonadotrofinas, os folículos primários crescem até chegar ao estágio de folículos secundários pelo crescimento do oócito e por atividade mitótica entre as células da granulosa. Um folículo secundário é formado quando uma camada da teca é gerada a partir do tecido conjuntivo circundante (BRÄNNSTRÖM, 2004).

2.2.2 Crescimento folicular na fase antral (terciário e pré-ovulatório)

A fase antral da foliculogênese está caracterizada pela presença dos folículos terciários ou antrais, os quais são morfológicamente constituídos por um oócito que é circundado por uma zona pelúcida, uma cavidade antral repleta de fluido folicular, diversas camadas de células da granulosa, duas camadas de células da teca, a teca interna e a teca externa, e uma membrana basal (SILVA *et al.*, 2002).

O fluido folicular que está presente no interior do antro é constituído por água, proteínas séricas, eletrólitos e altas concentrações de estradiol e inibina, ambos produzidos pelas células da granulosa (MARTINS *et al.*, 2008). Este fluido folicular atua como uma importante fonte de substâncias regulatórias, como esteroides, enzimas, glicoproteínas, lipoproteínas e fatores de crescimento (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). A produção do fluido folicular é acentuada pelo aumento gradual da vascularização dos folículos, bem como a permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão intimamente correlacionados com o crescimento folicular antral (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Na espécie bovina, foi observada a formação dos folículos antrais aos 230 dias de gestação (RÜSSE, 1983). A partir deste estágio, o diâmetro do folículo aumentará notavelmente em virtude do crescimento oocitário, proliferação das células da granulosa, das células da teca e pela expansão da cavidade antral (DRIANCOURT, 2001).

Os pequenos folículos antrais crescem até alcançarem um diâmetro de 3 mm, independentemente de gonodotrofinas. A partir deste estágio, os folículos tornam-se dependentes destes hormônios até o estágio de folículos pré-ovulatórios, que tem um diâmetro em torno de 10 a 12 mm em *Bos indicus* e 12 a 15mm em *Bos taurus* (GINTHER, 2003).

Durante o desenvolvimento folicular na fase antral ocorrem três eventos principais, o recrutamento, a seleção e a dominância (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Além das gonadotrofinas, algumas substâncias que são produzidas localmente, dentre os quais pode-se destacar os peptídeos, que exercem um papel essencial no processo regulatório da fase antral, tanto por meio de mecanismos endócrinos como parácrinos (FORTUNE, 2003).

Dos folículos que foram recrutados a partir de um determinado grupo, somente um será selecionado para continuar se desenvolvendo (folículo dominante), mesmo em níveis baixos de FSH. Enquanto isso, os outros folículos (subordinados) começam a sofrer atresia, caracterizando esse processo como divergência folicular (GINTHER *et al.*, 1996). O folículo dominante reduz de forma passiva a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH), ou seja, os hormônios produzidos pelas células da granulosa do folículo dominante, estradiol e inibina, diminuem a liberação de FSH. A baixa concentração de FSH interrompe o desenvolvimento dos folículos subordinados, mas ainda é suficiente para promover o crescimento do folículo dominante (ALVES *et al.*, 2002). Durante o recrutamento folicular, um grupo de folículos torna-se dependente das gonodotrofinas e inicia seu desenvolvimento (BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995).

Já foi demonstrado que a dinâmica folicular acontece observando um padrão de ondas de crescimento folicular ao longo do ciclo estral, sendo que poderão ocorrer duas

(PIERSON & GINTHER, 1988; GINTHER; KNOPF & KASTELIC, 1989; FIGUEIREDO *et al.*, 1997) ou três ondas foliculares (SAVIO *et al.*, 1988; GAMBINI *et al.*, 1998; CASTILHO *et al.*, 2000). O número de ondas em que o crescimento folicular está envolvido pode sofrer influências de diversos fatores, dentre os quais pode-se destacar: o tempo de duração da fase luteínica (BARUSELLI *et al.*, 1997), baixa ingestão de nutrientes (MURPHY *et al.*, 1991), níveis plasmáticos de FSH e inibina-A (PARKER *et al.*, 2003).

Ao iniciar uma nova onda folicular, um determinado grupo de folículos é recrutado, apresentando crescimento simultâneo (fase de recrutamento), mas somente um deles será selecionado (fase de seleção). A partir de então, este folículo passará a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo assim o desenvolvimento e levando à inibição do recrutamento de um novo grupo de folículos. Na presença de níveis elevados de progesterona, o folículo dominante tornar-se-á anovulatório, em virtude da frequência na pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH) ser baixa (GINTHER; KNOPF & KASTELIC, 1989; GINTHER *et al.*, 1996).

A redução de FSH foi identificada como tendo um papel fundamental na fase de seleção folicular, pois foi verificado que a administração de FSH de forma exógena na fase de recrutamento impede o desvio, permitindo o desenvolvimento de diversos folículos dominantes (MIHM *et al.*, 1997).

Já foi demonstrado que a redução progressiva nos níveis de FSH e a elevação da frequência de liberação do LH são os dois principais eventos que definem a dominância folicular, sendo que o folículo dominante é o principal inibidor da secreção de FSH, e ao mesmo tempo ele tem a capacidade de manter sua sobrevivência em baixos níveis deste hormônio, pois ele apresenta uma maior quantidade de receptores para o LH. Na verdade, a divergência folicular acontece bem próxima do momento em que o FSH chega a atingir níveis basais, sendo isto crucial para a seleção de um único folículo ovulatório nas espécies monovulatórias (MIHM & EVANS, 2008).

O oócito de mamíferos sofre mudanças significativas durante o desenvolvimento folicular, inclusive no período em que o folículo se torna dominante, evento que antecede ao pico pré-ovulatório de LH. Essas mudanças são chamadas de capacitação, e tem papel fundamental na aquisição da competência (DIELEMAN *et al.*, 2002).

2.2.3 Atresia folicular

No que diz respeito à atresia folicular, que é responsável pela perda de cerca de 99,9% dos folículos ovarianos, ela pode ocorrer por degeneração ou apoptose. No caso da degeneração, uma das causas principais é a isquemia, onde há a falta do aporte de oxigênio e também de nutrientes para os ovários, levando assim à morte dos folículos (FARBER, 1982). A atresia por apoptose é um tipo de morte celular programada, individual e ativa, sendo distinguida pela desintegração nuclear e formação de corpos apoptóticos (RACHID *et al.*, 2000), algo que depende da expressão de genes, onde o desequilíbrio entre os genes anti- e pró-apoptóticos ocasionam a morte das células (HURWITZ & ADASHI, 1992).

2.3 Importância das gonadotrofinas para a foliculogênese

As gonadotrofinas desempenham um papel importante no crescimento dos folículos ovarianos (LEVI-SETTI *et al.*, 2004), visto que a regulação da foliculogênese é um processo resultante da ação entre fatores locais e endócrinos (SILVA *et al.*, 2006a).

O FSH é extremamente importante para o desenvolvimento folicular *in vitro*, mas não é a única substância envolvida. Os folículos pré-antrais já possuem receptores para FSH (TISDALL *et al.*, 1995) e vários estudos *in vitro* demonstraram que o FSH, em concentrações que variam de 1ng/mL a 1 µg/mL, promove aumento do diâmetro oocitário e crescimento de folículos pré-antrais até a formação de antro em diferentes espécies (bovinos: GUTIERREZ *et al.*, 2000). Recentemente, em caprinos, Saraiva *et al.*, (2010) demonstraram que o FSH, em concentrações crescentes (dia 0 – 6: 100 ng/mL, dia 6 – 12: 500 ng/mL, dia 12 – 18: 1000 ng/mL, promove o desenvolvimento de folículos pré-antrais até os oócitos estarem aptos a maturação durante 18 dias de cultivo. Além disso, a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos foram observados após adição de FSH ao meio de cultivo *in vitro* (MATOS *et al.*, 2007). O LH atua nas fases finais da foliculogênese estimulando a retomada da meiose e promovendo a maturação citoplasmática dos oócitos. *In vivo*, a liberação do pico de LH estimula os folículos pré-ovulatórios que já expressam receptores de LH nas células do *cumulus* e da granulosa, que é essencial para a retomada da meiose oocitária e para a ovulação. O LH atua inibindo a proliferação das células do *cumulus* e aumentando a produção de progesterona (MATTIOLI, 1994).

A diferenciação das células da granulosa presente em folículos imaturos (pré-antrais) e em folículos maduros (pré-ovulatórios) envolve um processo de transformação que é influenciada por numerosos fatores neuromoduladores endócrinos e parácrinos (RICHARDS, 1980;. HSUEH *et al.*, 1984). Assim, as citocinas podem atuar como reguladores autócrinos ou

parácrinos da função folicular ovariana sem entrar na circulação sistêmica (SPICER & ALPIZAR, 1994). Em adição aos seus efeitos imunológicos conhecidos, citocinas demonstraram regular a esteroidogênese nas células foliculares *in vitro* (ADASHI, 1990a; ADASHI, 1990b; HURWITZ *et al.*, 1991a).

2.4 As citocinas e as suas funções na foliculogênese

A IL-1 α e IL-1 β foi inicialmente identificada como reguladora do sistema imunológico, mas também afeta as funções do ovário (ADASHI *et al.*, 1990c). O sistema IL-1 é composto por dois ligantes bioativos, IL-1 α e IL-1 β (DINARELLO *et al.*, 1994), dois receptores, IL-1RI e IL-1RII (SIMS *et al.*, 1993b), e um antagonista do receptor IL-1RA, que regula a atividade biológica da IL-1 por uma ação competitiva sobre os receptores (AREND *et al.*, 1991). O IL-1RI é uma glicoproteína de 80 kDa (DOWER *et al.*, 1985), e IL-1RII tem uma massa molecular de 60-65 kDa (MATSUSHIMA *et al.*, 1986; McMAHAN *et al.*, 1991). Todos eles são expressos ou apresentam efeitos sobre uma grande variedade de tecidos, incluindo as células do ovário (KOL *et al.*, 1999a).

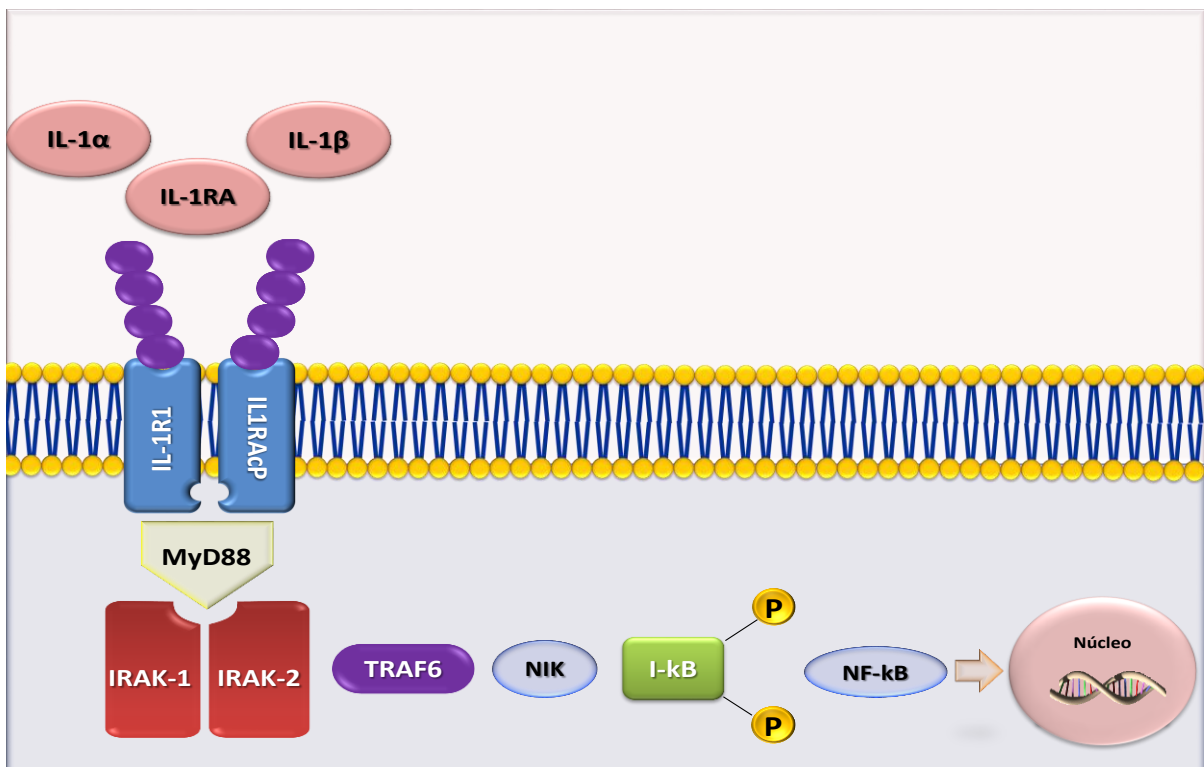


Figura 1. Via de Sinalização da Interleucina 1 (IL-1), mostrando as moléculas que estão envolvidas na cascata de sinalização. Interleucina 1 (IL-1), receptor de interleucina 1 (IL-1RI), receptor acessório da proteína da interleucina 1 (IL-1RAcP), proteína de diferenciação mieloide (MyD88), quinases associadas ao receptor de interleucina 1 (IRAKs), fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), proteína quinase NF-kB indutoras de quinase (NIK), NF-kB inibidor de proteínas (I-kB), fator de transcrição nuclear (NF-kB). Adaptado de GREENFEDER *et al.*, 1995.

Em ratos, o principal subtipo de receptor no ovário durante a foliculogênese é o receptor do tipo 1 (IL-1RI), que é expresso em níveis elevados nos folículos, e muito constante, contrastando com a expressão muito baixa de IL-1RII (SCHERZER *et al.*, 1996). O segundo receptor, IL-1RII (McMAHAN *et al.*, 1991), também se liga a IL-1, porém não inicia a transdução do sinal (SIMS *et al.*, 1993b). O terceiro membro da família, IL-1RA é uma proteína glicosilada de 22 kDa (HANNUM, *et al.*, 1990), sendo considerada um antagonista dos receptores altamente seletivos e competitivos, que se liga ao receptor IL-1RI impedindo a ligação desse receptor com a AcP (proteína necessária para o sinal subsequente), bloqueando todas as ações da IL-1 α e IL-1 β (GREENFEDER *et al.*, 1995). O IL-1RA se associa aos receptores de IL-1 impedido suas respostas biológicas e fisiológicas (DINARELLO, 1996; BALAKRISHNAN *et al.*, 1998). A IL-1RA é uma proteína glicosilada de 22 kDa (HANNUM, *et al.*, 1990). As três moléculas são formadas como precursores, e, enquanto pro-IL-1 α e pro-IL-1RA são biologicamente ativos, a pro-IL-1 β é inativa, necessitando ser clivada por uma enzima caspase-1 para que a mesma seja liberada em sua forma ativa (THORNBERRY *et al.*, 1992). A IL-1 α e IL-1 β podem ser armazenados na célula após a tradução como um precursor de (Pro-IL-1) de 31 kDa, sendo que a Pro-IL-1 é biologicamente ativa como na forma madura, e ela atua no meio intracelular (ROUX-LOMBARD, 1998). Kurt-Jones *et al.*, (1985) e BAILLY *et al.*, (1990) demonstraram a existência de um tipo de IL-1 α transmembranar de 23kDa.

IL-1 α e IL-1 β são dois agonistas funcionais da família da IL-1. Acredita-se que elas induzem respostas celulares idênticas, mas há relatos de diferenças nas suas atividades, desempenhando um papel essencial no processo inflamatório e na resposta imune. Por exemplo, a produção de anticorpos dependente de célula T é mediada pela IL-1 β , mas não pela IL-1 α (NAKAE *et al.*, 2001) (Figura 1).

As citocinas são sintetizadas por uma ampla variedade de células, e são capazes de estimular ou inibir o crescimento e a diferenciação celular, induzir quimiotaxia e modular a expressão de outras citocinas. Muitos estudos têm documentado a produção intraovariana de citocinas pró-inflamatórias durante a ovulação (MACHELON & EMILIE, 1997), sendo secretadas a partir de células do sistema imunológico que foram recrutadas da circulação sanguínea para o espaço extra vascular do estroma ovariano, e também a partir das células somáticas do ovário, incluindo as células da granulosa e tecais (BRÄNNSTRÖM, 2004; INGMAN & JONES, 2008).

O sistema IL-1, incluindo os receptores e ligantes foram evidenciados como sendo produzidos em diversos locais do ovário (células da granulosa, células da teca e oócitos) e

estão ligados à ovulação, a produção de enzimas proteolíticas, regulação do fator ativador do plasminogênio, síntese do óxido nítrico e a produção de prostaglandinas, além de controlar a esteroidogênese ovariana (GÉRARD, *et al.*, 2004; ORSI, *et al.*, 2007).

A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune contra infecções e agressões, sendo produzida principalmente por monócitos e macrófagos (BIRD *et al.*, 2002). A IL-1 α e a IL-1 β são potentes citocinas pró-inflamatórias, ao passo que o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), age como uma citocina anti-inflamatória, e compete com a IL-1 α e IL-1 β na ligação aos receptores da IL-1, sem efeitos intrínsecos (DINARELLO, 1998; AREND, 1990). A IL-1 exerce influência em diversas funções biológicas (DINARELLO, 1988), ou seja, aumenta a quimiotaxia de linfócitos T e B; estimula a síntese de tromboxanos por neutrófilos e macrófagos; estimula liberação de histamina por basófilos e degranulação dos eosinófilos; estimula a síntese de interferon β 1 e β 2; age como um pirógeno endógeno; induz a síntese de proteínas de fase aguda (ex. proteína C reativa e fibrinogênio) em hepatócitos (ENDRES, VAN DER MEER, DINARELLO, 1987); ativa linfócitos T (MIZEL, 1982) e aumenta a síntese de anticorpos pelas células B (FALKOFF *et al.*, 1983).

2.5 Ovulação

Em bovinos, a ovulação está marcada por uma interação dinâmica entre fatores que ainda não estão totalmente elucidados, culminando assim com a ruptura do estigma ovulatório e consequente liberação do oócito. Esse processo ovulatório é ativado pelas gonadotrofinas (FSH e LH) que são liberadas pela adeno-hipófise após estímulo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) sintetizado no hipotálamo (ESPEY, 1980; RUSSELL & ROBKER, 2007). O processo de ovulação se inicia no momento em que folículo recebe o estímulo pelo pico pré-ovulatório do LH. Os folículos tornar-se-ão aptos para ovular no momento em que os mesmos adquirirem o *status* de dominantes (≥ 10 mm de diâmetro). Esses folículos terão uma maior responsividade ao pico de LH no momento em que eles estiverem em tamanhos maiores de 12 mm de diâmetro (SARTORI *et al.*, 2001). Na espécie bovina, por volta de 2 horas após a aplicação de um análogo de GnRH, acontece o pico de LH (KOMAR *et al.*, 2001). O receptor de LH (LHR), pertencente à superfamília dos receptores ligados a proteína G, além de estar presente nas células da teca, possui seus níveis aumentados nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios de ratos (PENG *et al.*, 1991), murinos (EPPIG *et al.*, 1997) e em bovinos (ROBERT *et al.*, 2003). Foi ainda demonstrado por Robert *et al.* (2003) que diferentes isoformas de transcritos para o receptor de LH (LHR) são expressos nas células

da granulosa em todas as fases do desenvolvimento folicular, mas somente os transcritos de LHR que estão presentes nos folículos dominantes possuem a capacidade de produzir uma proteína que seja funcional.

Estudos mostram que com o pico de LH, a adenilato ciclase é ativada via LHR, que, por conseguinte promove o aumento nas concentrações de AMPc nas células da granulosa, a qual promove a ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (MARSH, 1976; RICHARDS, 2001; CONTI, 2002). A PKA catalisa a fosforilação da proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (*CREB – AMPc response element-binding protein*), um fator de transcrição nuclear que promove o aumento da transcrição de genes que estão envolvidos no processo de ovulação (RICHARDS, 2001). Destacam-se os fatores de crescimento semelhantes ao EGF, como a ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e β -celulina (BTC) que sofrem estimulação por meio do pico de LH via AMPc (PARK *et al.*, 2004). O processo de transativação do receptor do EGF (EGFR) ocorre nas células da granulosa e nas células do *cumulus* pela enzima proteolítica ADAM17 (ou TACE, enzima conversora do TNF), que promove a liberação do domínio desses fatores (AREG e EREG) e regula a fosforilação da MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) (YAMASHITA *et al.*, 2007; PANIGONE *et al.*, 2008; YAMASHITA *et al.*, 2009; YAMASHITA & SHIMADA, 2012). É essencial o processo de fosforilação de ERK1/2 nas células da granulosa para que aconteça a ovulação em mamíferos, pois foi verificado que camundongos *Knockout* para ERK1/2 nas células da granulosa, os oócitos apresentaram-se inclusos nos folículos e sem a formação de corpo lúteo, mesmo após serem submetidos à superovulação (FAN *et al.*, 2009).

As prostaglandinas são produtos originados do ácido araquidônico pela via ciclooxigenase (COX). A COX, entretanto é composta por duas principais isoformas (COX-1 e COX-2), sendo que a COX-1 é constitutiva e a COX-2 é induzida. A COX-2 por sua vez somente é aumentada nas células da granulosa (LIU *et al.*, 1997; RICHARDS, 1997), bem como os níveis das prostaglandinas E2 (PGE2) e F2 alfa (PGF2 α) no fluido folicular também são elevados (SIROIS, 1994; LIU *et al.*, 1997) em resposta ao estímulo de gonadotrofinas. Ainda, na espécie bovina, a expressão de RNAm e proteína para COX-2 foi demonstrada nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (LIU *et al.*, 1997; LIU & SIROIS, 1998). Já a prostaglandina E2 apresenta efeito semelhante ao LH, participando dos processos ovulatórios por induzir a síntese dos fatores de crescimento semelhantes ao EGF via AMPc/PKA e MAPK (BEN-AMI *et al.*, 2006; SHIMADA *et al.*, 2006).

Logo após o pico de LH, os níveis de progesterona (P4) tornam-se mais elevados com relação aos níveis de estradiol (E2) no ovário, e a partir de então, dará início ao processo

de luteinização (KOMAR *et al.*, 2001). No fluido folicular, os níveis de E2 decrescem a partir de 3 horas após a aplicação de GnRH (hora 0) na espécie bovina (TONELLOTTO DOS SANTOS, 2012), e baixando em torno de 70% na hora 12 (KOMAR *et al.*, 2001). A diminuição nos níveis intrafoliculares de E2, se dá pela redução de enzimas esteroidogênicas como a 17 α -hidroxilase (17 α OH), refletindo assim na redução da produção de andrógeno, e aromatase (P450), diminuindo assim da capacidade das células da granulosa de converter andrógenos em E2 (KOMAR *et al.*, 2001). A síntese de P4, por conseguinte, é regulada pela 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD), pois ao aplicar um inibidor de 3 β -HSD (trilostano) intrafolicular em vaca induzidas com GnRH, os níveis de progesterona no fluido folicular foram então diminuídos, e as vacas ovulam normalmente (LI *et al.*, 2007).

2.6 Interleucinas e seus efeitos na ovulação

Vários estudos têm reportado que, em diversas espécies de mamíferos, a IL-1 é um fator parácrino que pode estar envolvido na cascata de eventos que levam à ovulação (BEN-SHLOMO & ADASHI, 1994).

A ovulação pode ser considerada uma reação inflamatória que implica na mobilização de neutrófilos e a participação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (BRÄNNSTRÖM, 2004), sendo que os folículos ovarianos representam um local de síntese, bem como recepção e ação do TNF- α (BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1994; ROBY & TERRANOVA, 1989, 1990) e da IL-1 β (BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1993b).

Assim, a ovulação é comparada a um processo cíclico semelhante a uma inflamação (ESPEY, 1980), sendo que a IL-1 é uma mediadora de inflamação já estabelecida, que pode desempenhar um papel intermediário (HURWITZ *et al.*, 1991a). Esses peptídeos afetam diretamente a função secretora das células da teca e/ou das células da granulosa com efeito estimulante ou inibitório sobre a biossíntese de prostaglandinas e esteroidogênese (OTANI *et al.*, 1996).

Estudos *in vitro* mostraram que IL-1 β regula algumas atividades das células da granulosa e das células da teca, como esteroidogênese e promove a ovulação em ratas (BRÄNNSTRÖM *et al.*, 1993b) e coelhas (TAKEHARA *et al.*, 1994). Além disso, a IL-1 β induz o rompimento da vesícula germinativa de oócitos em coelhas (TAKEHARA *et al.*, 1994) e induz a retomada da meiose em oócitos equinos (MARTORIATI *et al.*, 2002), sugerindo um papel potencial de IL-1 β na maturação nuclear do oócito (CAILLAUD *et al.*,

2005). Desta forma, sabe-se que a IL-1 β é um fator parácrino que está envolvido na cascata de eventos que levam à ovulação (BEN-SHLOMO *et al.*, 1994) e a maturação oocitária. Em adição, a IL-1 β tem sido evidenciada a participar na indução da ovulação, facilitando a ruptura folicular (VASSILIADIS *et al.*, 2005). Foi demonstrado ainda que a IL-1 β também suprime a apoptose em folículos antrais iniciais (CHUN *et al.*, 1996, 1995). Acredita-se que a IL-1 β exerce sua ação através de receptores presentes nas células da teca (HURWITZ *et al.*, 1992).

3. PROBLEMA

- ✓ Será que os RNAs mensageiros e as proteínas para o sistema IL-1 são expressos em todos os estágios de desenvolvimento folicular ovariano em bovinos?
- ✓ Será que ocorre um aumento nos níveis de expressão do RNAm para os membros do sistema interleucina IL-1 durante o desenvolvimento de folículos secundários para pequenos e grandes folículos antrais?
- ✓ Será que a interleucina 1 β está envolvida na ativação de folículos primordiais cultivados *in vitro*?

4. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, tornou-se evidente que as citocinas são importantes reguladores intraovarianos, agindo por sua vez de forma benéfica no ovário mamífero. Um conceito emergente é que as citocinas, como a IL-1, são fundamentais na regulação da foliculogênese, ovulação e na função do corpo lúteo. No entanto, em bovinos, as funções biológicas da IL-1 durante a foliculogênese ainda não foram totalmente elucidadas. Apesar deste sistema exercer um importante papel na ovulação, ainda não se sabe se as proteínas e o RNAm para esse fator e seus receptores são expressos em ovários bovinos. Além disso, não se conhece os efeitos da IL-1 durante a ativação e/ou desenvolvimento de folículos pré-antrais, bem como de pequenos e grandes folículos antrais. No ovário mamífero, cerca de 90 a 95% dos folículos encontram-se quiescentes e constituem o *pool* de reserva folicular. Para que estes folículos possam entrar em fase de crescimento, é necessário que sejam ativados, retomando a capacidade de proliferação das células da granulosa e aumento do volume citoplasmático e nuclear do oócito. Sabendo-se da importância e do valor econômico que a espécie bovina representa para o país, é extremamente importante o desenvolvimento de um sistema de cultivo capaz de ativar o *pool* de folículos quiescentes, seguido do desenvolvimento *in vitro*. Sendo assim, para compreender o crescimento dos folículos em diferentes categorias, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente poderá contribuir para a propagação de biotécnicas reprodutivas para uma melhor compreensão sobre os fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral, necessários para a sobrevivência, a ativação e o início do crescimento folicular. Até o momento sabe-se que a ativação, crescimento e desenvolvimento folicular são orquestrados por hormônios, fatores de crescimento e outras substâncias que irão agir de forma autócrina ou parácrina na regulação deste crescimento, sendo que os mecanismos reguladores desses processos são pouco conhecidos em bovinos.

Diferentes substâncias vêm sendo utilizadas em sistemas de cultivo visando a manutenção da viabilidade folicular, bem como o estímulo ao crescimento de folículos pré-antrais *in vitro*, incluindo algumas citocinas como LIF (fator inibidor da leucemia), membro da família da interleucina 6 (IL-6). No entanto, a IL-1 ainda não foi identificada em folículos pré-antrais e nem utilizada no cultivo *in situ* de fragmentos de córtex de ovários. Desta forma, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente que a utilize poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão acerca dos fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral e de proteínas e fatores necessários para a sobrevivência, a ativação e o início do crescimento folicular.

5. HIPÓTESES

Conforme mostrado na revisão de literatura, a foliculogênese é um processo complexo regulado por diferentes hormônios e fatores de crescimento e esse processo pode ser influenciado pelos componentes do sistema IL-1. Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- 1) Os RNAs mensageiros e as proteínas para o sistema IL-1 são expressos nos folículos ovarianos bovinos em todos os estágios de desenvolvimento.
- 2) Ocorre um aumento nos níveis de expressão de RNAm para o sistema IL-1 durante o desenvolvimento folicular pré-antral e antral.
- 3) A interleucina 1 β promove a ativação de folículos primordiais cultivados *in vitro*.

6- OBJETIVOS

6.1 Objetivos gerais

- 1) Caracterizar a distribuição das proteínas e quantificar os RNAs mensageiros do sistema IL-1 por imunohistoquímica e western blot nas diferentes categorias de folículos ovarianos bovinos.
- 2) Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de IL-1 beta na ativação de folículos primordiais bovinos cultivados *in vitro*.

6.2 Objetivos específicos

- 1) Localizar as proteínas para IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII por imunohistoquímica e western blot nos diferentes compartimentos foliculares em ovários bovinos.
- 2) Quantificar os RNAs mensageiros para o sistema interleucina 1 em folículos pré-antrais, bem como em células do *cumulus*, oócitos e na parede folicular de folículos antrais menores que 3mm e maiores que 3mm.
- 3) Avaliar os efeitos de 0, 1, 10, 50 e 100 ng/mL de IL-1 β na ativação, sobrevivência e viabilidade de folículos primordiais bovinos cultivados *in vitro*.

7. ARTIGO I

Protein and mRNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin -1 β on primordial follicle activation and survival in vitro

Artigo a ser submetido para a revista *Domestic Animal Endocrinology*

Protein and mRNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin -1 β on primordial follicle activation and survival *in vitro*

J. R. S. Passos¹; J. J. N. Costa¹; E. V. da Cunha¹; A. W. B. Silva¹; R. P. Ribeiro¹; G. B. de Souza¹; P. A. A. Barroso¹; A. M. P. Dau²; M. V. A. Saraiva¹; P. B. D. Gonçalves²; R. van den Hurk³; J. R. V. Silva¹

¹Biotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brazil. ²University Veterinary Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ³Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

Corresponding address (J. R. V. Silva): Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocéllo Rocha Ponte 100, CEP: 62.041-040, Sobral, CE, Brazil. [roberto_viana@yahoo.com]

Abstract

This study aims to investigate the expression of interleukin 1 system members (proteins and mRNA of ligands and receptors) and its distribution in ovarian follicles of cyclic cows, as well as to evaluate the effects of interleukin-1 β (IL-1 β) on the survival and activation of primordial follicles *in vitro*. The ovaries were processed for localization of interleukin 1 system in preantral and antral follicles by immunohistochemical, real time PCR and western blot analysis. For *in-vitro* studies, ovarian fragments were cultured in α -MEM⁺ supplemented with IL-1 β (0, 1, 10, 50 or 100 ng/mL), and after 6 days the cultured tissues were processed

for histological analysis. Immunohistochemical results showed that the interleukin 1 system proteins IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII were detected in the cytoplasm of oocytes and granulosa cells from all follicular categories, and theca cells of antral follicles. Variable levels of mRNA for the interleukin 1 system members were observed at different stages of development. After 6 days of culture, the presence of IL-1 β (10 or 50 ng/mL) was effective in maintaining the percentage of normal follicles and in promoting primordial follicle activation. In conclusion, interleukin 1 system members are differentially expressed in the ovarian follicles according to their stage of development. Moreover, IL-1 β promotes the development of primordial follicles. These results suggest an important role of the interleukin 1 system in the regulation of bovine folliculogenesis.

Keywords: bovine, interleukin 1 system, gene expression, primordial follicles

1. Introduction

Ovarian follicular development is regulated by several substances, such as hormones, growth factors and cytokines (1). Interleukins are pro-inflammatory cytokines that have been reported to be involved in both endometriosis and ovarian carcinogenesis (2,3) and actively participate in the process of ovulation (4); (5). The interleukin system 1 (IL-1) consists of two bioactive ligands, IL-1 α and IL-1 β (6), two receptors, IL-1RI and IL-1RII (7) and a receptor antagonist (IL-1RA) that regulates the biological activity of IL-1 in a competitive action on the receptor (8). IL-1RI is a glycoprotein of 80 kDa (9) and IL-1RII has a molecular weight of 60-65 kDa (10); (11). Both receptors IL-1RI and IL-1RII can bind to IL-1. However, only IL-1RI may mediate the signal of IL-1 (12); (13); (14). IL-1RII can not mediate the IL-1 signal due to its tail being the cytoplasmic domain of 29 amino acids, compared with the IL-1RI,

which has 215 amino acids (7). When IL-1 binds to IL-1RI, a conformational change occurs in the receptor, which allows the association of IL-1RA to IL-1-IL-1RI complex (15); (16); (17). The association of IL-1RA to the IL-1-IL-1RI complex is essential for signaling (18); (19); (20). All these receptors and ligands are expressed and are effective in a wide variety of tissues, including rat ovarian cells (21-23).

It is known that components of interleukin system are expressed in oocytes, cumulus and mural granulosa cells of rat antral follicles (21). Not long ago, (24) reported that the ovary is a site for action and production of interleukins in various mammalian species. Previously, it was shown that IL-1 modulates rat (25) and bovine (26) granulosa cell proliferation *in vitro*, dependent on the follicle size, and inhibits steroidogenesis in bovine undifferentiated follicles, but stimulates the release of progesterone in differentiated follicles (26); (27). In addition, IL-1 promoted the proliferation of ovarian cells, suppression of apoptosis, as well as follicular growth (28). These authors also reported that IL-1 β acts on granulosa and theca cells to regulate steroidogenesis and ovulation in rats (29). This cytokine also promotes germinal vesicle breakdown in rabbit oocytes (30), and stimulates the resumption of meiosis and nuclear oocyte maturation in mares (31), (32). However, there is no information about the mRNA expression of the interleukin 1 system proteins IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI, IL-1RII and the protein localization of these ligands and their receptors in bovine ovarian follicles. In addition, the effects of IL-1 β on early follicular development in bovine species are still not known.

The present study was carried out to examine the existence of an intrafollicular interleukin 1 system (ligands and receptors) and its distribution in ovarian follicles of cyclic cows and to find evidence of a role of this system in early folliculogenesis. Therefore, mRNA for interleukin 1 system expression was investigated by real time polymerase chain reaction (PCR), while the presence and cellular localization of the corresponding proteins were

analyzed by immunohistochemistry and Western Blot. The effects of IL-1 β on primordial follicle activation and survival *in vitro* were also investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Experiment 1: protein localization and mRNA quantification for IL-1 system members in bovine ovarian follicles

2.1.1. Collection of ovaries

Ovaries from adult mixed breed cows (*Bos taurus*) were collected at a slaughterhouse. After collection, the ovaries were washed (for approximately 10 s) in 70% alcohol, then washed twice in 0.9% saline solution, and transferred to minimum essential medium-alpha (α -MEM – Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) supplemented with 100 mg/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. Subsequently, ovarian pairs from each cow were transported to the laboratory within 1 h at 4°C (33).

2.1.2. Immunohistochemistry

Ovaries (n=12) were fixed overnight at room temperature in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS (pH 7.4), and subsequently dehydrated and embedded in paraffin wax (QEEL, São Paulo, SP, Brazil) in preparation for immunohistochemical studies. To determine the localization of IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII and IL-1RA, serial 7- μ m sections were cut from ovaries of ten different cows. These sections were mounted on poly-L-lysine-coated slides, dried overnight at 37°C, deparaffinised in xylene and rehydrated in a graded ethanol

series. Endogenous peroxidase was blocked by incubating the deparaffinised sections in 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min. The sections were then washed with PBS, and the epitopes were activated by incubating the sections for 30 min at 95°C in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0). Then, the sections were washed in PBS/0.05% Tween (PBS-T; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) before being incubated for 30 min with 1% normal goat serum in PBS to minimize non-specific binding. The primary antibodies were as follows: 1) rabbit anti-interleukin-1 β ; 2) rabbit anti-interleukin-1 RI; 3) rabbit anti-interleukin-1 RII and 4) rabbit anti-interleukin 1-RA (All from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The final antibody dilutions were 1:50. The sections were incubated overnight at 4°C in appropriate dilutions of the antibodies. All other incubations and washes were performed at room temperature. Unfortunately, the antibodies used to detect IL-1 α in bovine ovaries did not react. After incubation with an antibody, sections were washed three times with PBS-T and incubated for 45 min with biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG from Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), diluted 1:200 in PBS containing 5% normal goat serum. Next, the sections were washed three times in PBS-T before being incubated for 45 min with an avidin–biotin complex (1:600) (Vectastain Elite ABC kits; Vector Laboratories). The sections were then washed three times in PBS and stained with diaminobenzidine (DAB) (0.05% DAB in Tris/HCl, pH 7.6, and 0.03% H₂O₂ – Sigma tablets) until a precipitate formed or for a maximum of 7 min. The stained sections were rinsed in PBS and water, and counterstained for 10 s in Mayer’s haematoxylin. Finally, the sections were washed for 10 min in running tap water, and subsequently dehydrated in a graded ethanol series followed by xylene treatment and mounting in synthetic Canada balsam (Dinâmica Ltda, São Paulo, Brazil).

The ovarian follicles were classified in different categories: primordial, primary, secondary, small antral follicles (<3mm in diameter) and large antral follicles (>3mm). The

diameter of follicles was calculated by the method described by (34). The staining intensity was scored as follows: absent (-), weak (+), moderate (+ +) or strong (+ + +). Controls for non-specific staining were performed by (1) replacing the primary antibody with IgGs from the same species in which the specific antibody was raised, at the same concentration, (2) incubation with diaminobenzidine reagent alone to exclude the possibility of non-suppressed endogenous peroxidase activity, and (3) western blot analysis of protein expression in granulosa cells.

2.1.3. Western blot

Ovaries (n= 15) were collected at a local slaughterhouse as described previously. In the laboratory, granulosa cells were collected from ovarian follicles of non-pregnant adult cows. The granulosa cells were obtained of small antral follicles or large antral follicles. All follicles were apparently healthy with a good vascularization and had moderately transparent follicular fluid. Total protein from granulosa cells were extracted in RIPA Buffer solution (Radio-Immunoprecipitation Assay; Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Granulosa cell protein samples obtained using RIPA buffer were boiled at 95°C for 5 minutes, subjected to 12% SDS gel, and transferred into nitrocellulose membranes. After blocking for 2 hours with 5% nonfat milk / Tris buffered saline (TBS) containing 0.05% Tween 20 (TBS-T), blots were incubated overnight at 4°C with IL-1 β (1:200; sc-7884; H-153; Santa Cruz Biotechnology), IL-1RI (1:200; sc-688; N-20; Santa Cruz Biotechnology), IL-1RII (1:200; H-71; sc-292522; Santa Cruz Biotechnology), IL-1RA (1:200; H-110; sc-25444; Santa Cruz Biotechnology) or β -actin (1:5000; control; ab8227; Abcam Inc.), followed by three washes (5 minutes each) with TBS-T. The blots were then incubated with 1:2000 goat anti-rabbit secondary antibody (IgG-HRP; sc-2004; Santa Cruz Biotechnology) for 2 hours

with agitation, followed by three washes (5 minutes each) with TBS-T. Immunoreactive bands were detected using Clarity Western ECL (Bio-Rad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and visualized using ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

2.1.4. Real time PCR

Ovaries (n = 20) from adult cows were collected as described previously. To isolate preantral follicles (secondary), the ovaries were carefully dissected and placed immediately in warmed α -MEM. Briefly, ovarian cortical slices (1–2 mm thick) were cut from the ovarian surface and follicles were visualized under a stereomicroscope (SMZ645; Nikon, Tokyo, Japan) and manually microdissected from strips of ovarian cortex using 26 gauge (26G) needles. After isolation, these follicles were washed and three groups of 10 follicles were collected and stored at -80°C until RNA extraction. This procedure was completed within 2h.

A second group of ovaries (n=20) was collected as described previously, to isolate oocyte and cells from antral follicles. In the laboratory, the cumulus–oocyte complexes (COCs) were aspirated from small (<3 mm) and large (>3mm) antral follicles with an (18G) gauge needle. From the follicle content so collected, compact COCs were selected as described by (35). Thereafter, the cumulus was separated from the oocyte by a combination of vortexing and aspiration via a narrow-bore Pasteur pipette. Three groups of 10 denuded oocytes and three groups of cumulus cells from 10 COCs were stored at -80°C until RNA extraction. Then, the ovaries were also used to obtain follicular walls. To this end, follicles were isolated from the ovaries and dissected free of stromal tissue (36) and transparent follicles measuring 1–3 mm and >3 mm in diameter were selected. The follicles were sectioned into equal halves with a scalpel and the oocytes were removed and discarded.

To evaluate gene expression for interleukin 1 system (IL-1 α , IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII and IL-1RA), total RNA extraction was performed using Trizol[®] purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). According to the manufacturer's instructions, 800 μ L of Trizol solution was added to each frozen samples and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at 10,000 g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 Kunitz units/mL) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30 μ L RNase-free water. The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, England) and 1 μ g of total RNA was used for reverse transcription. Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70°C and then cooled in ice.

Reverse transcription was performed in a total volume of 20 μ L, which was comprised of 10 μ L of sample RNA, 4 μ L 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units RNase out, 150 units Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random primers (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM DTT, and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for 1 h at 42°C, for 5 min at 80°C, and then stored at -20°C. Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase. Quantification of mRNA was performed using GoTaq[®] qPCR Master Mix. PCR reactions were composed of 1 μ L cDNA as a template in 7.5 μ L of GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 5.5 μ L of ultra-pure water, and 0.5 μ M of each primer. The primers were designed by using the PrimerQuestSM program (<http://www.idtdna.com>) to perform amplification of IL-1 α , IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII, IL-1RA and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene (37)

(Table 1). The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 60°C. The final extension was for 10 min at 60°C. All reactions were performed in StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems). Relative quantifications of mRNA were carried out using the comparative threshold (Ct) cycle method. The delta-delta-Ct method was used to transform the Ct values into normalized relative expression levels (38).

2.1.5. Statistical analysis

Levels of mRNA for for interleukin 1 system (IL-1 α , IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII and IL-1RA) were analysed by using the paired t test and Kruskal-Wallis test with post-test Dunn (Graphad Instat, San Diego, CA, USA) were used to perform these comparative analyzes, with $P < 0.05$. Data were expressed as mean \pm SEM.

2.2. Experiment 2: effects of IL-1 β on bovine primordial follicles activation and survival

2.2.1. In-vitro culture of ovarian cortical tissue

Ovaries (n= 12) were collected as described previously. The culture system used was described in detail earlier by (39). Ovarian cortical tissue from the same ovarian pair was cut in 18 fragments (approximately 3 x 3 mm, with 1 mm thickness) using a scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were then either directly fixed for histology (uncultured control) or placed in culture for 6 days. Cortical tissues were transferred to 24-well culture dishes

containing 1 mL of culture media. Culture was performed at 39°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with ITS (10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin, and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, antibiotics 100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, 3.0 mg/mL of bovine serum albumin (BSA) (α -MEM⁺). The ovarian cortical fragments were cultured in control medium (α -MEM⁺) alone or supplemented with different concentrations of IL-1 β (0, 1, 10, 50, or 100 ng/mL), in accordance with (40). Every 2 days, the culture medium was replaced with fresh medium.

2.2.2. Histological analysis and follicle classification

After six days of culture, the pieces of ovarian tissue were fixed overnight at room temperature in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for histological studies. After fixation, the ovarian fragments were dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene, and embedded in paraffin wax. For each piece of ovarian cortex, 7- μ m sections were mounted on slides and stained with eosin and hematoxylin. Coded anonymized slides were examined under a microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at x100 and x400 magnification. The developmental stages of follicles were classified as primordial (one layer of flattened or flattened and cuboidal granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). These follicles were further classified individually as histologically normal when an intact oocyte was present, surrounded by granulosa cells that are well organized in one or more layers, and have no pyknotic nucleus. Degenerated follicles were defined as those with a retracted oocyte, which has a pyknotic nucleus and/or is surrounded by disorganized granulosa cells, which are detached from the

basement membrane. Overall, approximately 150 follicles were evaluated for each treatment. The percentages of primordial and developing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in a particular medium, as well as of those classified as morphologically normal after 6 days of culture in medium supplemented with different concentrations of interleukin 1 β , the differences were considered significant when $P < 0.05$.

2.2.3. Statistical analysis

The percentages of primordial and developing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in a particular medium, as well as of those classified as morphologically normal after 6 days of culture in medium supplemented with different concentrations of interleukin 1 β were compared by chi-square test (Graphpad Instat, San Diego, CA, USA). The differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1: protein localization and mRNA quantification for IL-1 system in bovine ovarian follicles

3.1.1. Immunohistochemistry

The relative intensity of immunohistochemical staining for interleukin system in all follicle types studied is illustrated in Table 2. Immunohistochemical results showed that the proteins for interleukin 1 system (IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII) were detected in the different follicular compartments. A weak reaction for IL-1 β in oocytes and granulosa cells of

primordial follicles was observed, although moderate to strong immunoreactions were observed in oocyte, granulosa and theca cells from primary to antral follicles. Immunoreactivity for IL-1RA was not found in oocytes of primordial and primary follicles, except for granulosa cells of primary follicles that were marked. However, weak to moderate reactions were observed in oocyte and granulosa cells of secondary and antral follicles, while theca cells were occasionally stained (Fig. 1). Oocytes and granulosa cells from primordial and primary follicles had a weak reaction for IL-1RI, although secondary and small antral follicles had a moderate to strong staining in oocyte, granulosa and theca cells. For IL-RII, weak reactions were observed in oocytes of all follicular categories, while a moderate to strong staining was observed in granulosa cells. Theca cells had a moderate staining in large antral follicles (Fig. 2). For all antibodies tested, control reactions (Figs. 1G and 2G) confirmed the absence of non-specific staining.

3.1.2 Western Blot

Western blotting analyses confirmed the presence of reactivity to IL-1 β precursor (pro-IL-1 β - 31kDa), IL-1 β (17kDa), IL-1RA (20kDa) IL-1RI (80kDa) and IL-1RII (46kDa) in granulosa cells of antral follicles at different stages of development (Figure 3A-E), confirming the specificity of immunohistochemical reaction.

3.1.3 Quantification of mRNA for interleukin 1 system in bovine ovary

The mRNA levels for IL-1 α (Figure 4A) and IL-1RA (Figure 4C) in the oocyte, cumulus cells and follicular wall from small antral follicles (<3mm) were significantly higher than in secondary follicles (Figure 4B). In addition, the expression of IL-1 β and IL-1RI in the

cumulus cells and follicular wall were significantly higher than in secondary follicles. Moreover, the expression of IL-1RI in the oocyte was significantly lower than in secondary follicles (Figure 4D).

In small antral follicles (<3mm), the mRNA expressions of IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA and IL-1RI (Figure 5A-D) in follicular walls were significantly increased compared to those in oocytes and in cumulus cells. No difference was observed in the IL-1RI mRNA levels in these follicle compartments (Figure 5E). In large antral follicles (>3mm), IL-1 α , IL-1 β and IL-1RA mRNA was expressed at higher levels in follicular walls than in oocytes and cumulus cells (Figure 6A-C). However, the levels of IL-1RI and IL-1RII mRNA were higher in cumulus cells than in oocytes and follicular walls (Figure 6D-E).

IL-1 α mRNA expression in oocytes, cumulus cells and follicular walls from small antral follicles (<3 mm) was higher than in large antral follicles (>3 mm) (Figure 7A). In contrast, IL-1 β mRNA expression in COCs from large follicles was higher than in small antral follicles (Figure 7B). Higher mRNA levels of IL-1RA were observed in oocytes and cumulus cells from large antral follicles, while no difference was observed in regard follicular walls of small and large antral follicles (Figure 7C). Likewise, no differences were found in the mRNA expression of IL-1RI in these antral follicles (Figure 7D). Furthermore, the levels of IL-1RII mRNA were higher in cumulus cells and follicular wall from large antral follicles than in small ones (Figure 7E). It was observed that as the follicle grows, there is an increase in expression of IL-1 system.

3.2. Experiment 2: effects of IL-1 β on bovine primordial follicles activation and survival

Histological analysis showed that normal (Fig. 8A) and degenerated (Fig. 8B) follicles were found in both uncultured and cultured ovarian cortical tissue. Degenerated

follicles had a shrunken oocyte, with pyknotic nucleus or disorganized granulosa cells. A total of 1105 follicles were counted to evaluate follicular morphology and activation in this experiment.

The effects of the different treatments on the percentage of surviving follicles at the end of culture are shown in Figure 9. At the end of the culture period, all the treatments reduced the percentage of normal follicles, when compared to that in uncultured ovarian tissue ($P < 0.05$). Among treatments, IL-1 β (100ng/ml) significantly decreased the percentage of normal follicles.

Compared to uncultured control tissue, after 6 days of culture, all treatments promoted a decrease in the percentage of primordial follicles and consequent increase in the percentage of developing follicles ($P < 0.05$). Moreover, when compared to the other treatments, presence of 10 and 50ng/mL of IL-1 β in culture medium resulted in a significant increase in the percentage of developing follicles. The results are shown in Figures 10 and 11.

4. Discussion

This study is the first to report the presence of interleukin-1 system members in different follicular categories and different compartments of follicles in bovine ovarian tissue. The presence of proteins of interleukin I system members in all the follicular classes (primordial, primary, secondary and antral follicles) was demonstrated by immunohistochemistry. In parallel, the presence of mRNA for these proteins proves the synthetic activity in the bovine follicle.

The results from immunohistochemical studies demonstrate the presence of IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII in the oocyte and granulosa cells of primordial, primary and secondary follicles. In small and large antral follicles, these proteins were found in oocytes, cumulus cells and the mural granulosa. It was observed that as the follicle grows, there is an

increase in expression of IL-1 system. Western blot analysis confirmed that, except IL-1 α , proteins of the IL-1 system are present in granulosa cells from bovine antral follicles. IL-1 β was previously demonstrated in oocytes, granulosa, theca and cumulus cells in ovarian tissue of the human (41); (42); (43); (44), mouse (45); (46), rat (47); (21) and mare (31); (48). IL-1 α protein was previously detected in mouse (45); (46) and human (43) oocytes, theca and cumulus cells (22) demonstrated that ovarian cells synthesize IL-1 α and that this production is IL-1 β -dependent. Moreover, IL-1 β was found to be produced by ovarian granulosa cells of preovulatory follicles (49); (50). The presence of IL-1RA was demonstrated in granulosa and cumulus cells in mare (31); (48) and human (43). The presence of IL-1RI protein was previously demonstrated in oocytes, granulosa, theca and cumulus cells in ovarian tissue of mouse (45), rat (51); (21), woman (52), (51); (43) and mares (31); (48). In mouse, the expression of IL-1RI varies with follicular development (53). In human, it has been demonstrated that mRNA for IL-1RI is absent in primordial follicles, but present in granulosa and theca cells from growing follicles (secondary and antral) (51).

The present study showed the presence of mRNA for IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII in preantral follicles, as well as in oocytes, cumulus cells and follicular wall of small and large antral follicles of bovine ovaries. Previously, the components of the interleukin-1 system were located in various types of ovarian cells, i.e., in oocytes, granulosa and theca cells of several mammalian species (24). Using *in-situ* hybridization, the transcript for IL-1 β was located in mural granulosa cells, the most inner layers of the theca, and in the oocytes of rat preantral and early antral follicles (23). The same technique demonstrated IL-1RI mRNA in murine oocytes (54) and abundant levels of IL-1RA mRNA in the granulosa of rat primordial and growing follicles (51).

In this study, compared to secondary follicles, high levels of mRNA for IL-1 α , IL-1 β and their receptors were demonstrated in oocytes, cumulus cells and follicular walls from

small antral follicles. Studies have shown that (i) mare COCs contain IL-1 β mRNA (31), (ii) IL-1 β is secreted by cultured human granulosa cells (44), (iii) production of ILs and their receptors was demonstrated in both granulosa and theca cells, while maximal production occurred in preovulatory follicle after gonadotropin action (28); (55). Furthermore, the IL-1 β gene appeared expressed during the assembly of rat primordial follicles (56).

In the present study, after 6 days of *in-vitro* culture, IL-1 β (10 and 50 ng/mL) contributed in maintaining follicle survival. It is not known by which mechanism IL-1 β acts to maintain this survival and to stimulate the development of preantral follicles. In mouse preovulatory follicles, IL-1 β suppressed the spontaneous onset of apoptosis in cultured follicles, but stimulated nitric oxide (NO) production (57). In contrast, addition of IL-1 receptor antagonist eliminated this, confirming receptor mediation. Moreover, addition of NG-monomethyl-L-arginine, a NO synthase inhibitor, reversed both IL-1 β stimulation of NO production and suppression of apoptosis, suggesting a mediatory role of NO in these IL-1 β effects. Taken together, these findings suggest that IL-1 β is a survival factor for ovarian follicles, its action being partially mediated via NO and cGMP generation (57). In contrast, a recent study in mice reported that IL-1 β emerges as an important participant in the age-related exhaustion of ovarian reserve in mice, possibly by enhancing the expression of inflammatory genes and promoting apoptotic pathways (58). IL-1 β appeared capable to promote proliferation of rat (25) and bovine (59) granulosa cells and to suppress apoptosis of rat ovarian follicles (57), and thus is a survival factor for follicles.

In this work, IL-1 β (10 and 50 ng/mL) increased the percentage of developing follicles after 6-days culture. Previous studies observed that IL-1 β controls the transition of follicular cells by facilitating their proliferation and differentiation (28), while it is able to modulate steroidogenesis and promote the proliferation of granulosa cells porcine: (60); bovine: (61); human: (62). Treatment with IL-1 β also stimulated a small increase in the

production of cAMP, estrogen, and progesterone in mice, which are essential for growth and follicular development (57). In parallel, in caprine, it has been demonstrated that the presence of other cytokines, like leukemia inhibitory factor (LIF) is able to improve the activation and survival primordial follicles (63).

Based on our results we suggest that the IL-1 system is an important intraovarian regulator in bovine species. Thus, ovarian tissue may be the target site of IL-1 and that interaction of this compound with other chemical substances (FSH, TGF- β 1, NO) may regulate the survival and to stimulate the development of preantral follicles and steroidogenesis. Previous studies indicate that IL-1 has an important role in steroidogenesis of granulosa cells and theca cells of antral follicles rat: (51); human: (49); (50). In a review article, (24) described the important role of ILs and other cytokines in the control of different mammalian ovarian functions, such as ovarian cell proliferation, apoptosis, folliculogenesis, luteogenesis, oogenesis, release of hormones, response to upstream hormonal regulators, fertility and, in some cases, in the development of ovarian disorders.

A study has shown that interleukin-8 is present in the theca and granulosa of healthy and atretic antral follicles in humans and that can be linked to chemokine these follicle atresia (Chang et al., 1998). Sarapik et al. (2012) observed that high levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 α) in ovarian follicles are related to polycystic ovary syndrome in women. And that IL-23 and TNF- α expression is associated with endometriosis. Runesson et al. (2000) demonstrated the presence of high concentrations of IL-8 in the follicular fluid of preovulatory follicles in women. Furthermore, the interleukin is detected in the midst of granulosa cell cultures and theca cells. These data provide evidence that IL-8 may be involved in the stages of follicular development, ovulation and hormonal regulation.

In conclusion, this study demonstrates protein localization and expression of interleukin-1 system members in different follicular compartments and at different follicular

stages. Furthermore, at concentrations of 10 and 50 ng/mL, IL-1 β promotes activation of follicles that had been *in-vitro* cultured for 6 days. This study opens new prospects for examination of the physiological and pharmacological mechanisms underlying the regulation.

REFERENCES

- 1 Shimizu T, Kaji A, Murayama C, Magata F, Shirasuna K, Wakamiya K, Okuda K, Miyamoto A. Effects of interleukin-8 on estradiol and progesterone production by bovine granulosa cells from large follicles and progesterone production by luteinizing granulosa cells in culture. *Cytokine* 2012;57:175-181.
- 2 Keita M, AinMelk Y, Pelmus M, Bessette P, Aris A. Endometrioid ovarian cancer and endometriotic cells exhibit the same alteration in the expression of interleukin-1 receptor ii: To a link between endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2011;37:99-107.
- 3 Keita M, Bessette P, Pelmus M, Ainmelk Y, Aris A. Expression of interleukin-1 (il-1) ligands system in the most common endometriosis-associated ovarian cancer subtypes. *J Ovarian Res* 2010;3:3.
- 4 Murayama C, Kaji A, Miyauchi K, Matsui M, Miyamoto A, Shimizu T. Effect of vegf (vascular endothelial growth factor) on expression of il-8 (interleukin-8), il-1beta and their receptors in bovine theca cells. *Cell biology international* 2010;34:531-536.
- 5 Field SL, Dasgupta T, Cummings M, Orsi NM. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Molecular reproduction and development* 2014;81:284-314.
- 6 Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1994;8:1314-1325.
- 7 Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, et al. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type i receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:6155-6159.
- 8 Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *The Journal of clinical investigation* 1991;88:1445-1451.
- 9 Dower SK, Kronheim SR, March CJ, Conlon PJ, Hopp TP, Gillis S, Urdal DL. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *The Journal of experimental medicine* 1985;162:501-515.
- 10 Matsushima K, Akahoshi T, Yamada M, Furutani Y, Oppenheim JJ. Properties of a specific interleukin 1 (il 1) receptor on human epstein barr virus-transformed b lymphocytes: Identity of the receptor for il 1-alpha and il 1-beta. *Journal of immunology* 1986;136:4496-4502.
- 11 McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, et al. A novel il-1 receptor, cloned from b cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *The EMBO journal* 1991;10:2821-2832.
- 12 O'Neill LA, Greene C. Signal transduction pathways activated by the il-1 receptor family: Ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *Journal of leukocyte biology* 1998;63:650-657.
- 13 Jensen LE, Muzio M, Mantovani A, Whitehead AS. Il-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the il-1 receptor accessory protein. *Journal of immunology* 2000;164:5277-5286.
- 14 Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, O'Neill LA. Annotating genes with potential roles in the immune system: Six new members of the il-1 family. *Trends in immunology* 2001;22:533-536.
- 15 Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:13757-13765.
- 16 D'Ettorre C, De Chiara G, Casadei R, Boraschi D, Tagliabue A. Functional epitope mapping of human interleukin-1 beta by surface plasmon resonance. *European cytokine network* 1997;8:161-171.
- 17 Casadio R, Frigimelica E, Bossù P, Neumann D, Martin MU, Tagliabue A, Boraschi D. Model of interaction of the il-1 receptor accessory protein il-1racp with the il-1 β /il-1ri complex. *FEBS Letters* 2001;499:65-68.
- 18 Korherr C, Hofmeister R, Wesche H, Falk W. A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. *European journal of immunology* 1997;27:262-267.
- 19 Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. Myd88: An adapter that recruits irak to the il-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7:837-847.

- 20 Arend WP, Palmer G, Gabay C. Il-1, il-18, and il-33 families of cytokines. *Immunological reviews* 2008;223:20-38.
- 21 Kol S, Donesky BW, Ruutiainen-Altman K, Ben-Shlomo I, Irahara M, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. Ovarian interleukin-1 receptor antagonist in rats: Gene expression, cellular localization, cyclic variation, and hormonal regulation of a potential determinant of interleukin-1 action. *Biol Reprod* 1999;61:274-282.
- 22 Kol S, Ruutiainen-Altman K, Scherzer WJ, Ben-Shlomo I, Ando M, Rohan RM, Adashi EY. The rat intraovarian interleukin (il)-1 system: Cellular localization, cyclic variation and hormonal regulation of il-1beta and of the type i and type ii il-1 receptors. *Molecular and cellular endocrinology* 1999;149:115-128.
- 23 Kol S, Wong KH, Ando M, Ben-Shlomo I, Adashi EY. Rat ovarian interleukin-1alpha: Interleukin-1-dependent in vitro expression. *Endocrine* 1999;11:269-275.
- 24 Sirotkin AV. Cytokines: Signalling molecules controlling ovarian functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011;43:857-861.
- 25 Karakji EG, Tsang BK. Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: Influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. *Biol Reprod* 1995;53:1302-1310.
- 26 Baratta M, Basini G, Bussolati S, Tamanini C. Effects of interleukin-1 beta fragment (163-171) on progesterone and estradiol-17 beta release by bovine granulosa cells from different size follicles. *Regulatory peptides* 1996;67:187-194.
- 27 Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 2004;215:135-141.
- 28 Brännström M. Potential role of cytokines in ovarian physiology: The case for interleukin-1. In: *The ovary*, In: Leung PCK AE, editors (Ed.), Elsevier-Academic Press Elsevier, 2004, pp 261-271.
- 29 Brannstrom M, Mayrhofer G, Robertson SA. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. *Biol Reprod* 1993;48:277-286.
- 30 Takehara Y, Dharmarajan AM, Kaufman G, Wallach EE. Effect of interleukin-1 beta on ovulation in the in vitro perfused rabbit ovary. *Endocrinology* 1994;134:1788-1793.
- 31 Martoriati A, Lalmanach AC, Goudet G, Gerard N. Expression of interleukin-1 (il-1) system genes in equine cumulus-oocyte complexes and influence of il-1beta during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2002;67:630-636.
- 32 Caillaud M, Duchamp G, Gerard N. In vivo effect of interleukin-1beta and interleukin-1ra on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2005;3:26.
- 33 Chaves RN, Martins FS, Saraiva MV, Celestino JJ, Lopes CA, Correia JC, Verde IB, Matos MH, Bao SN, Name KP, Campello CC, Silva JR, Figueiredo JR. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reproduction, fertility, and development* 2008;20:640-647.
- 34 van den Hurk R, Dijkstra G, Hulshof SC, Vos PL. Micromorphology of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis, with particular reference to atypical granulosa cells. *Journal of reproduction and fertility* 1994;100:137-142.
- 35 van Tol HT, Bevers MM. Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of fsh-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Molecular reproduction and development* 1998;51:315-321.
- 36 Richard FJ, Sirard MA. Effects of follicular cells on oocyte maturation. Ii: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 1996;54:22-28.
- 37 Reboucas EL, Costa JJ, Passos MJ, Silva AW, Rossi RO, van den Hurk R, Silva JR. Expression levels of mrna for insulin-like growth factors 1 and 2, igf receptors and igf binding proteins in in vivo and in vitro grown bovine follicles. *Zygote* 2014;22:521-532.
- 38 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods* 2001;25:402-408.
- 39 Silva JR, van den Hurk R, de Matos MH, dos Santos RR, Pessoa C, de Moraes MO, de Figueiredo JR. Influences of fsh and egf on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* 2004;61:1691-1704.
- 40 Martoriati A, Caillaud M, Goudet G, Gerard N. Inhibition of in vitro maturation of equine oocytes by interleukin 1 beta via specific il-1 receptors. *Reproduction* 2003;126:509-515.

- 41 Zolti M, Ben-Rafael Z, Meirom R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, Apte RN. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertility and sterility* 1991;56:265-272.
- 42 Barak V, Yanai P, Treves AJ, Roisman I, Simon A, Laufer N. Interleukin-1: Local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. *Fertility and sterility* 1992;58:719-725.
- 43 de los Santos MJ, Anderson DJ, Racowsky C, Simon C, Hill JA. Expression of interleukin-1 system genes in human gametes. *Biol Reprod* 1998;59:1419-1424.
- 44 Carlberg M, Nejaty J, Froyso B, Guan Y, Soder O, Bergqvist A. Elevated expression of tumour necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 2000;15:1250-1255.
- 45 Simon C, Frances A, Piquette G, Polan ML. Immunohistochemical localization of the interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation, and luteinization. *Biol Reprod* 1994;50:449-457.
- 46 Terranova PF, Rice VM. Review: Cytokine involvement in ovarian processes. *American journal of reproductive immunology* 1997;37:50-63.
- 47 Brannstrom M, Pascoe V, Norman RJ, McClure N. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertility and sterility* 1994;61:488-495.
- 48 Martoriati A, Gerard N. Interleukin-1 (il-1) system gene expression in granulosa cells: Kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2003;1:42.
- 49 Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: Roles in implantation and early placentation. *Seminars in reproductive medicine* 2007;25:437-444.
- 50 Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue antigens* 2004;63:1-12.
- 51 Wang LJ, Brannstrom M, Cui KH, Simula AP, Hart RP, Maddocks S, Norman RJ. Localisation of mrna for interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the rat ovary. *J Endocrinol* 1997;152:11-17.
- 52 Hurwitz A, Loukides J, Ricciarelli E, Botero L, Katz E, McAllister JM, Garcia JE, Rohan R, Adashi EY, Hernandez ER. Human intraovarian interleukin-1 (il-1) system: Highly compartmentalized and hormonally dependent regulation of the genes encoding il-1, its receptor, and its receptor antagonist. *The Journal of clinical investigation* 1992;89:1746-1754.
- 53 Gerard N, Caillaud M, Martoriati A, Goudet G, Lalmanach AC. The interleukin-1 system and female reproduction. *J Endocrinol* 2004;180:203-212.
- 54 Deyerle KL, Sims JE, Dower SK, Bothwell MA. Pattern of il-1 receptor gene expression suggests role in noninflammatory processes. *Journal of immunology* 1992;149:1657-1665.
- 55 Ingman WV, Jones RL. Cytokine knockouts in reproduction: The use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. *Human reproduction update* 2008;14:179-192.
- 56 Nilsson E, Zhang B, Skinner MK. Gene bionetworks that regulate ovarian primordial follicle assembly. *Bmc Genomics* 2013;14:496.
- 57 Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJ. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology* 1995;136:3120-3127.
- 58 Uri-Belapolsky S, Shaish A, Eliyahu E, Grossman H, Levi M, Chuderland D, Ninio-Many L, Hasky N, Shashar D, Almog T, Kandel-Kfir M, Harats D, Shalgi R, Kamari Y. Interleukin-1 deficiency prolongs ovarian lifespan in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111:12492-12497.
- 59 Basini G, Baratta M, Bussolati S, Tamanini C. Interleukin-1 beta fragment (163-171) modulates bovine granulosa cell proliferation in vitro: Dependence on size of follicle. *Journal of reproductive immunology* 1998;37:139-153.
- 60 Fukuoka M, Yasuda K, Taii S, Takakura K, Mori T. Interleukin-1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1989;124:884-890.

- 61 Spicer LJ, Alpizar E. Effects of cytokines on fsh-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: Dependence on size of follicle. *Domestic animal endocrinology* 1994;11:25-34.
- 62 Best CL, Hill JA. Interleukin-1 alpha and -beta modulation of luteinized human granulosa cell oestrogen and progesterone biosynthesis. *Hum Reprod* 1995;10:3206-3210.
- 63 J.E. Nóbrega Jr. RR, M.H.T. Matos, R.N. Chaves, D.M. Magalhães, I.B. Lima-Verde, S.N. Bão, C.C. Campello, J.R. Figueiredo, P.B.D. Gonçalves, J.F.C. Oliveira Sphingosine 1-phosphate promotes activation of aprine preantral follicle in vitro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2014;66:9.

TABLE 1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis of cows cells and tissues.

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Sense, Anti-sense		Tm	Position	Genbank number
		s	as			
GAPDH	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA ATGGCGTGGACAGTGGTCATAA	s		55 / 55	288- 309 419-440	GI: 402744670 (<i>Bos taurus</i>)
			as			
IL-1 α	CTGAAACAGCCATGGCAACC GAAGGACTTCTGATTGAGAGAGA	s		57 / 57	18-37 160-138	GI: 27806576 (<i>Bos taurus</i>)
			as			
IL-1 β	CTGAAACAGCCATGGCAACC TGGATGCAGCTCTTCATCTGT	s		60 / 60	63-82 180-160	GI: 27806570 (<i>Bos taurus</i>)
			as			
IL-1RA	CCTGGGAACAAGACCCAGTC CTGGGGTTCCATCTGCACTT	s		60 / 60	702-721 802-783	GI: 3337109 (<i>Bos taurus</i>)
			as			
IL-1R1	GATTCCTTCTCTGGAGGCTGATAA ACGTGCGGGTGAAACCAG	s		60 / 60	310-333 379-362	GI: 332078460 (<i>Bos taurus</i>)
			as			
IL-1R2	ATCTCAGCCTCACTGGGGTC AAGGTGTTGTTGGCTGTCCA	s		60 / 60	834-853 937-918	GI: 402746659 (<i>Bos taurus</i>)
			as			

s: sense; as: anti-sense. Tm: Melting temperature

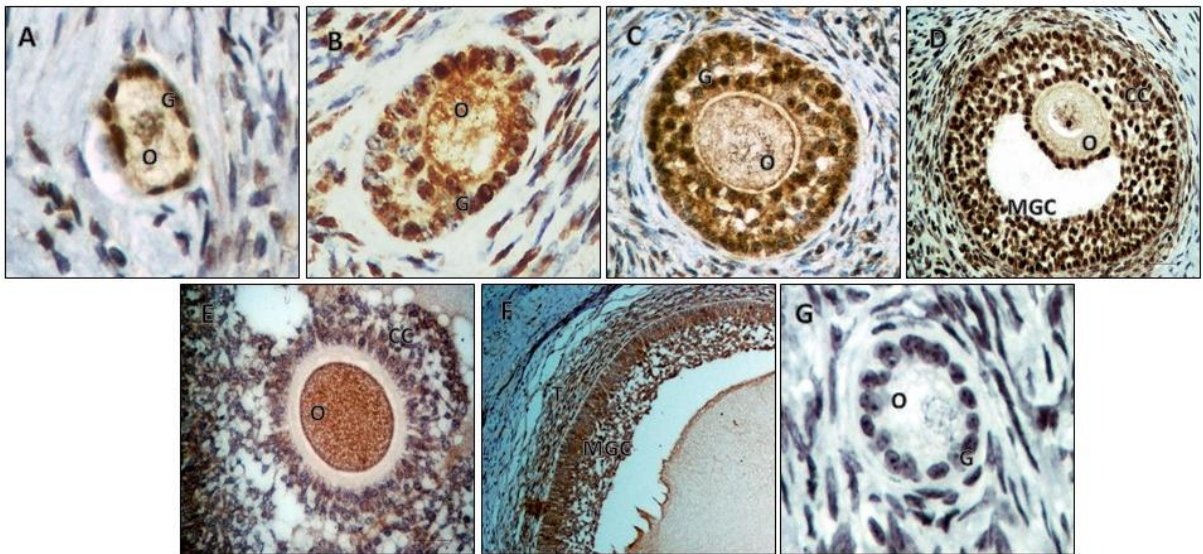
TABLE 2. Relative intensity of immunohistochemical staining for IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII, and localization of mRNA for IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII in the ovaries of cows.

Structure	IL-1 α		IL-1 β		IL-1RA		IL-1RI		IL-1RII
	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	mRNA
Primordial follicle									
Oocyte	◇	+	◇	-	◇	+	◇	+	◇
Granulosa	◇	+	◇	+/-	◇	+	◇	+/-	◇
Primary follicle									
Oocyte	◇	+	◇	-	◇	+	◇	+	◇
Granulosa	◇	++	◇	+/-	◇	+	◇	++	◇
Secondary follicle									
Oocyte	#	++	#	++	#	++	#	+	#
Granulosa	#	+++	#	++	#	++	#	+	#
Theca	#	-	#	-	#	-	#	-	#
Antral follicle < 3 mm									
Oocyte	+	++	+	++	+	++	+	+	+
Cumulus	+	+++	+	+++	+	++	+	+++	+
Mural granulosa	+*	+++	+*	+++	+*	++	+*	+++	+*
Theca	+*	++	+*	++	+*	++	+*	++	+*
Antral follicle >3mm									
Oocyte	+	++	+	++	+	+	+	+	+
Cumulus	+	++	+	++	+	++	+	++	+
Mural granulosa	+*	+++	+*	+++	+*	+++	+*	+++	+*
Theca	+*	++	+*	++	+*	++	+*	++	+*

Whole follicles; * Follicular wall. ◇ Not has been evaluated

(-) absent; (+/-); occasionally found; (+) weak; (++) moderate; (+++) strong immunoreactions

IL-1 β



IL-1RA

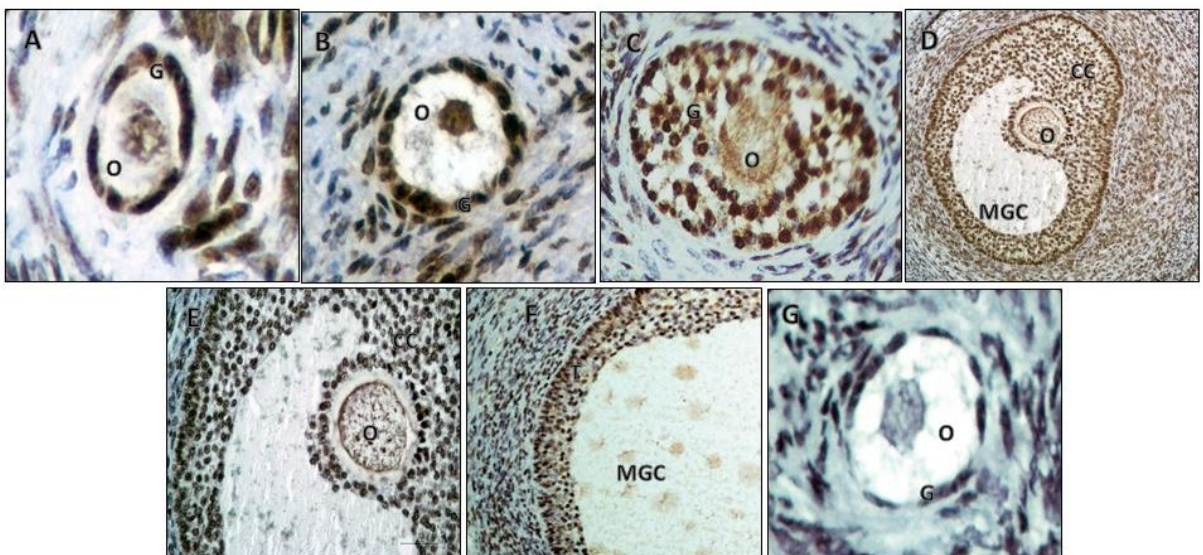
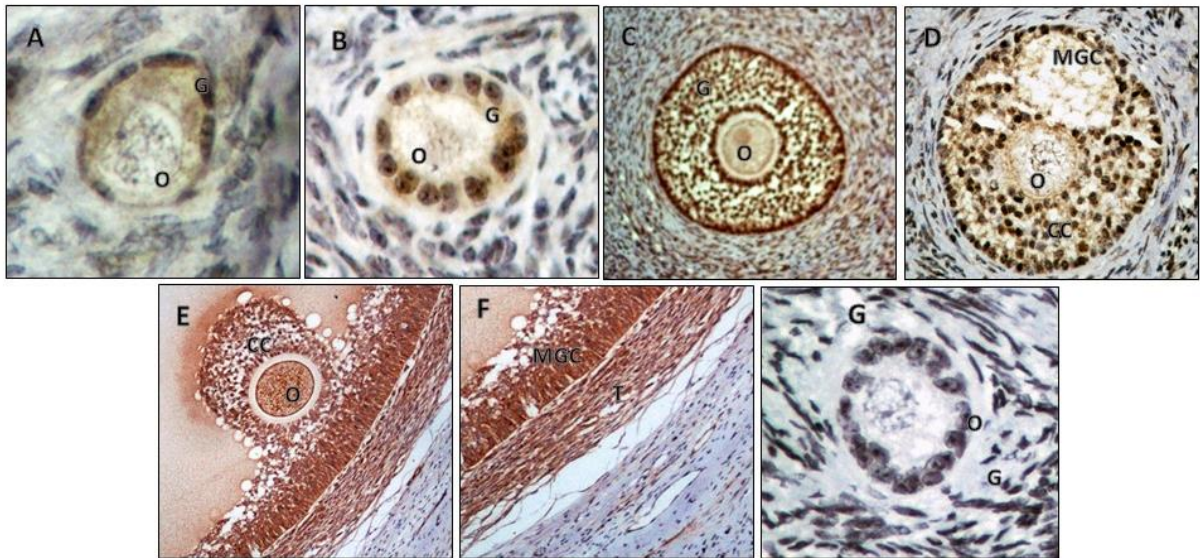


Figure 1A-G. IL-1 β and IL-1RA immunoreactivity in different follicular categories. (A) Primordial follicle, (B) primary follicle, (C) secondary follicle, (D) small antral follicle, (E) COC of a large antral follicle, (F) mural granulosa and theca cells from a large antral follicle, (G) negative control reaction. O: oocyte; G: granulosa cells; MGC: mural granulosa cells; CC: cumulus cells; T: theca cells. Scale bars represent 10 and 40 μ m.

IL-1RI



IL-1RII

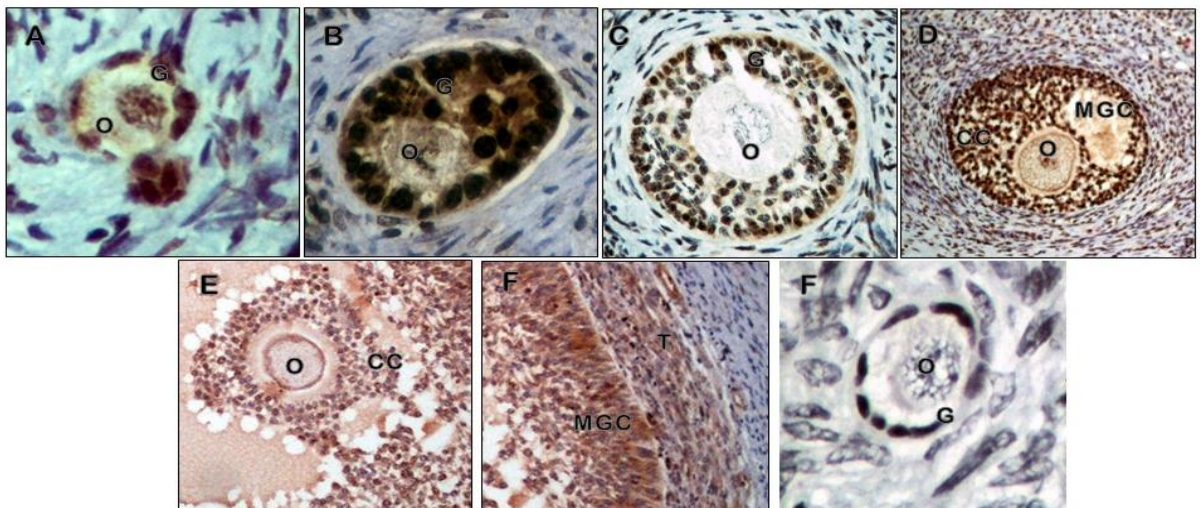


Figure 2A-G. Interleukin 1-RI and IL-1RII immunoreactivity in different follicular categories. (A) Primordial follicle, (B) primary follicle, (C) secondary follicle, (D) small antral follicle, (E) COC of a large antral follicle, (F) mural granulosa and theca cells from a large antral follicle, (G) negative control reaction. O: oocyte; G: granulosa cells; MGC: mural granulosa cells; CC: cumulus cells; T: theca cells. Scale bars represent 10 and 40 μm .

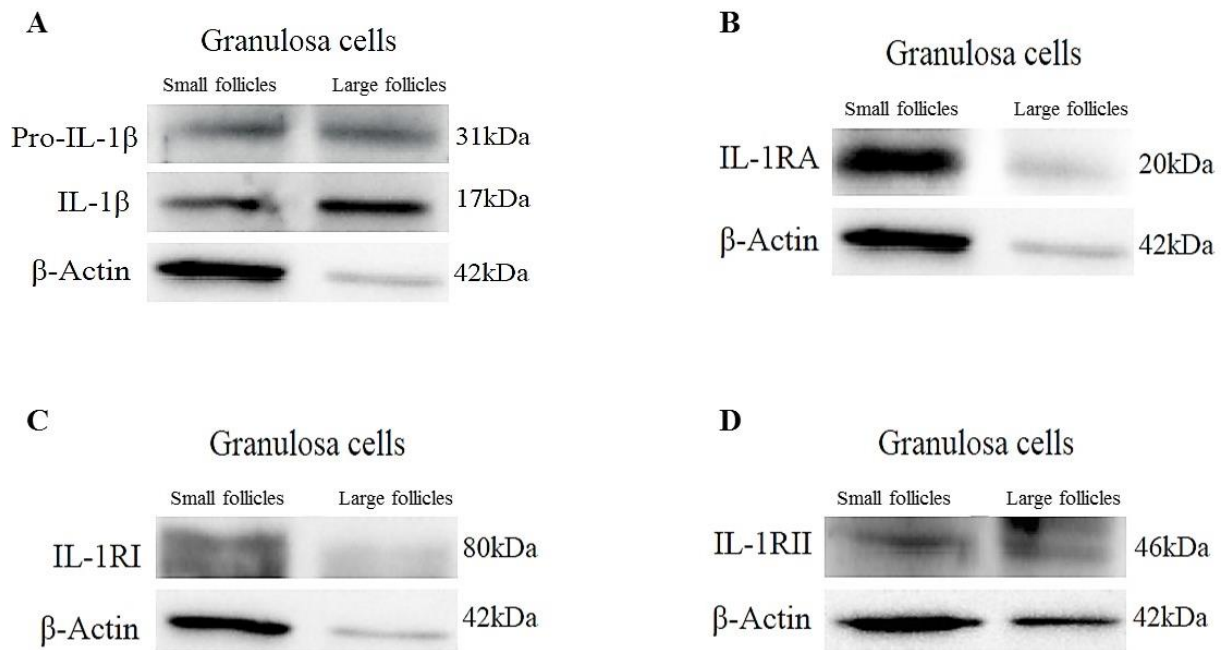


Figure 3A-E. Protein expression for members interleukin I system: IL-1 β and its precursor Pro-IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI, IL-1RII determined by Western blotting. Total protein levels were normalized to the loading control β -actin.

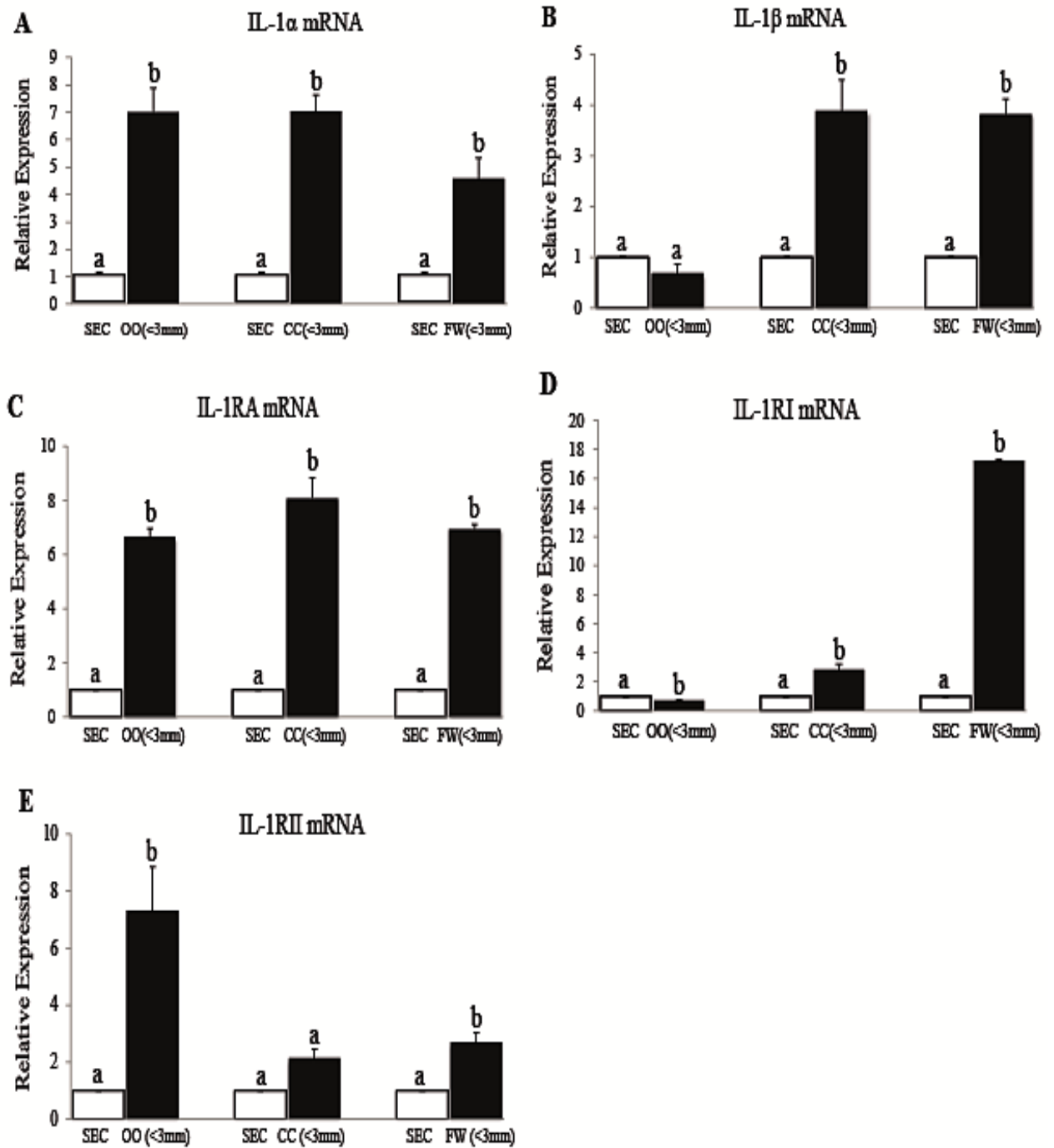


Figure 4A-E. Relative expression of mRNA for interleukin I system in bovine preantral (secondary) and small antral follicles (<3mm). SEC– secondary follicle; OO – oocyte; CC – cumulus cells; FW – follicular wall. Significantly different ($P < 0.05$).

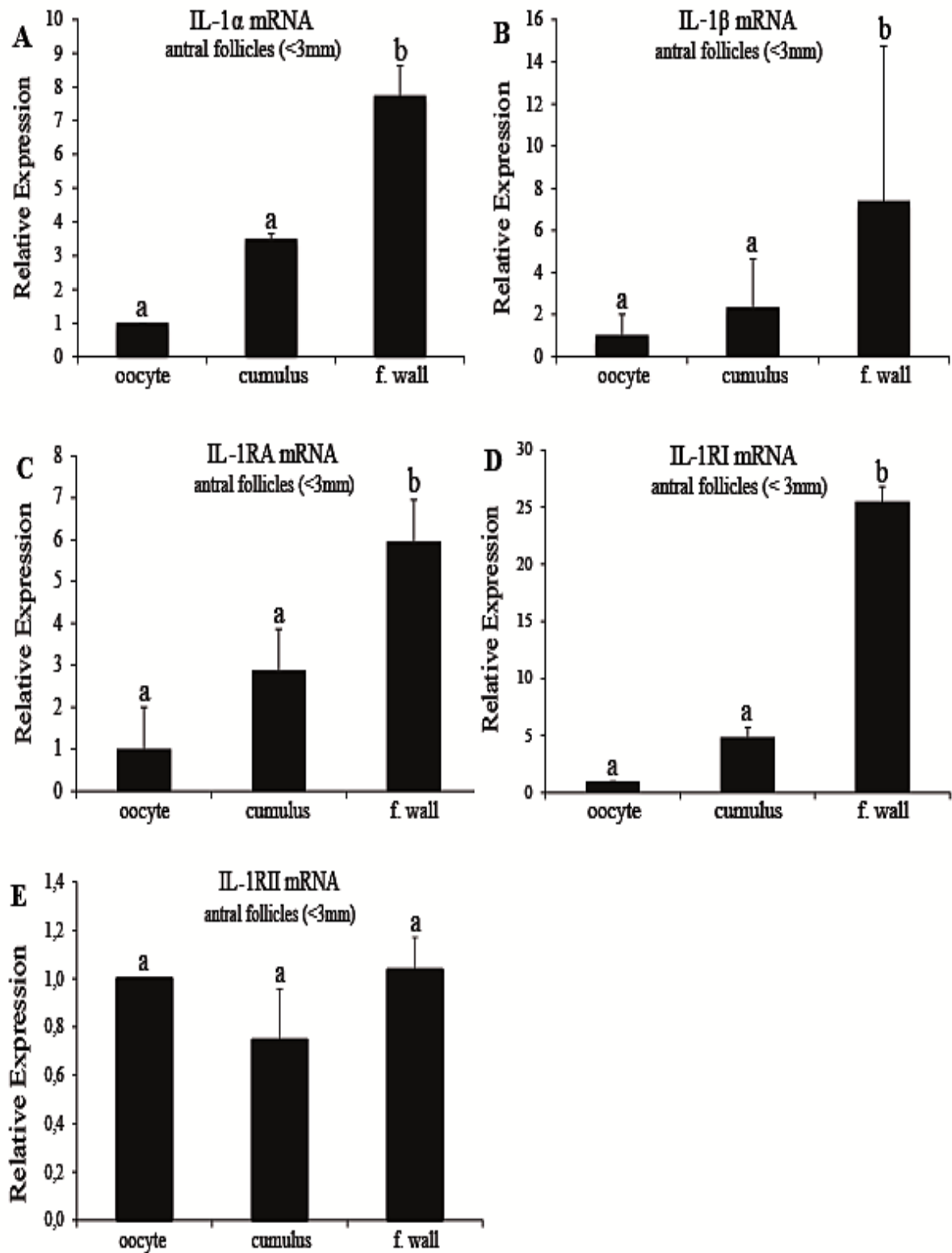


Figure 5A-E. Relative expression of mRNA for interleukin I system, in bovine small antral follicles. OO – oocyte; CC – *cumulus* cells; FW – follicular wall. Significantly different ($P < 0.05$).

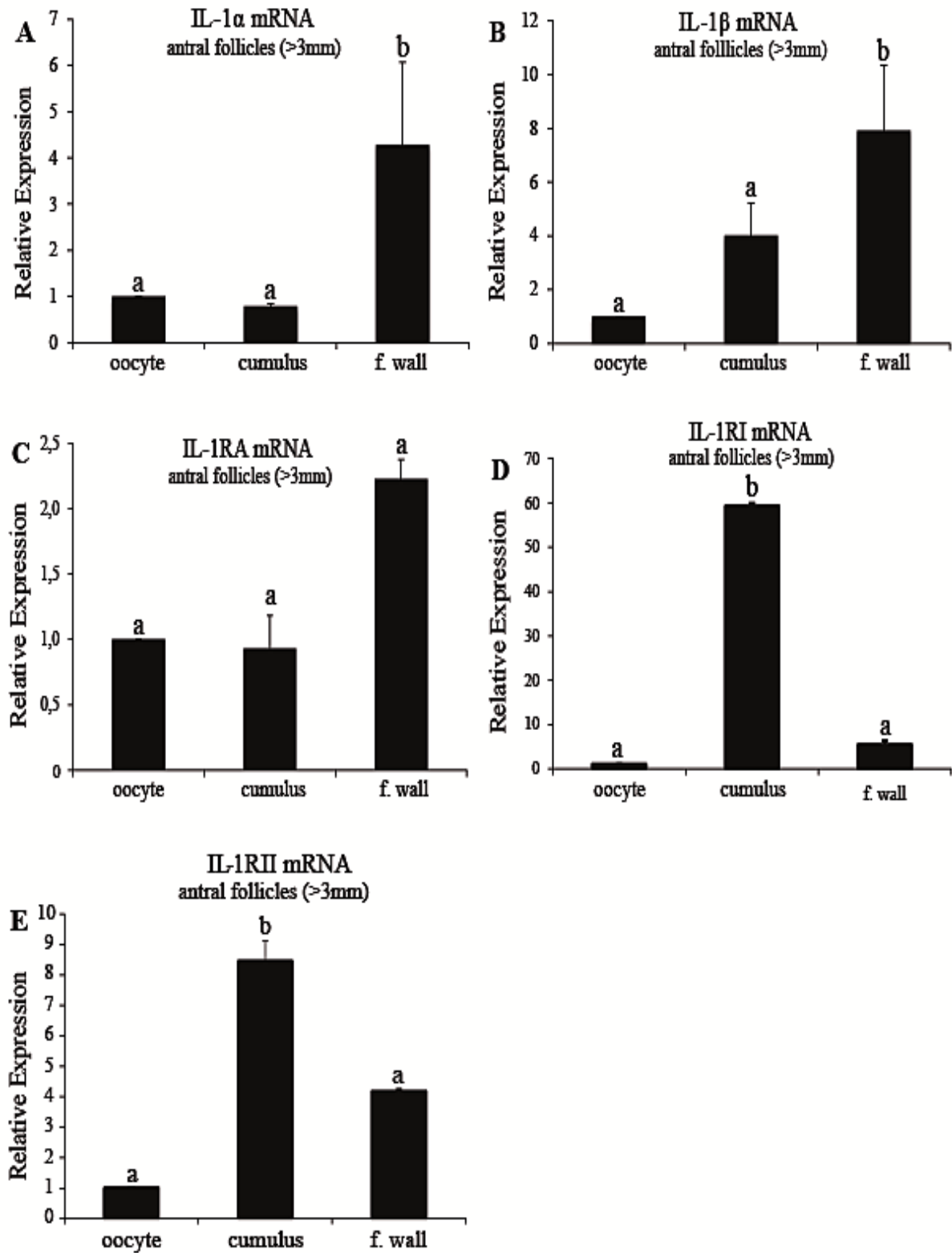


Figure 6A-E. Relative expression of mRNA for interleukin I system in bovine large antral follicle. OO – oocyte; CC – cumulus cells; FW – follicular wall. Significantly different ($P < 0.05$).

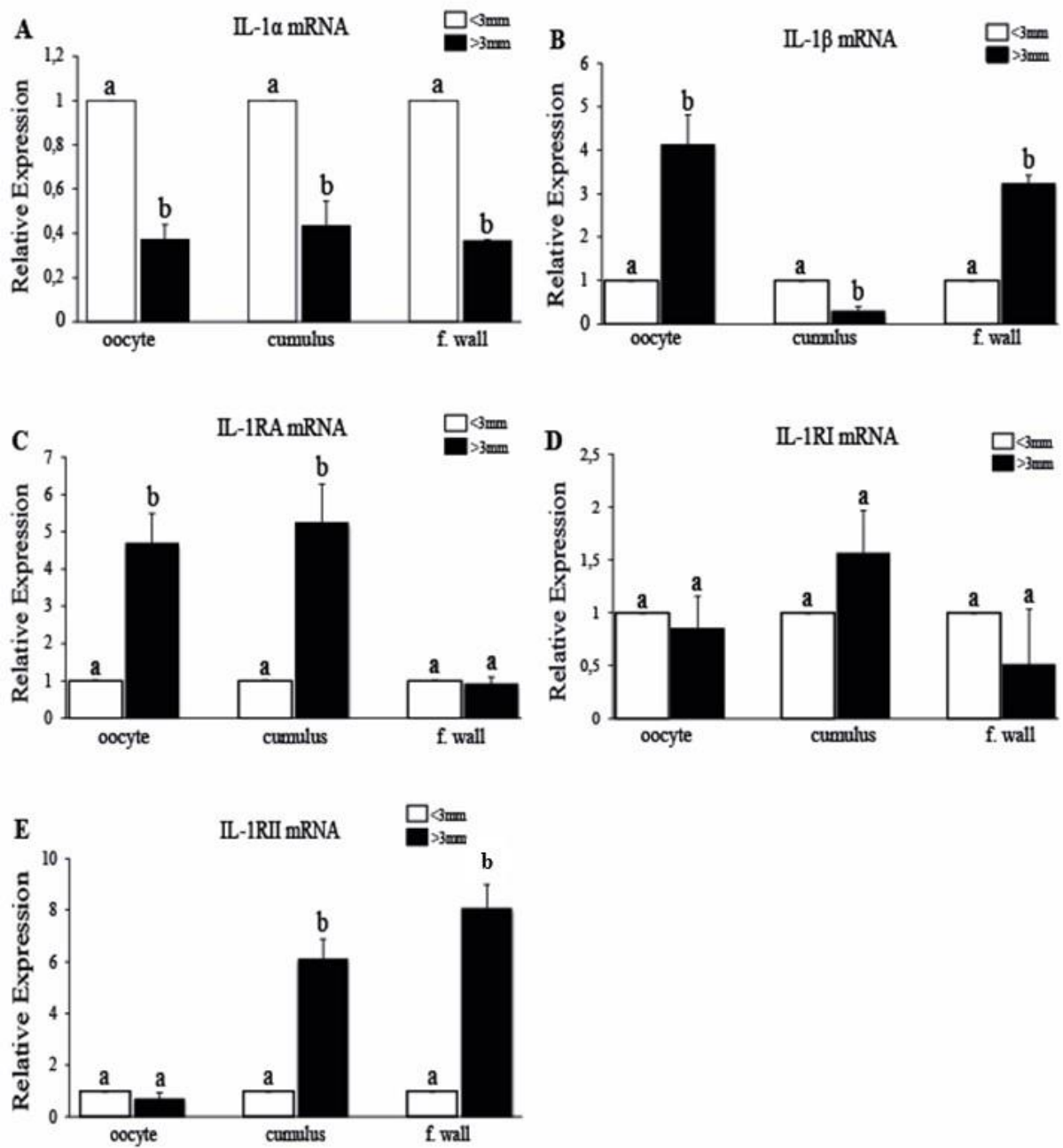


Figure 7A-E. Relative expression of mRNA for interleukin I system in small (<3mm) and large antral follicle (>3mm). OO – oocyte; CC – *cumulus* cells; FW – follicular wall. Significantly different ($P < 0.05$).

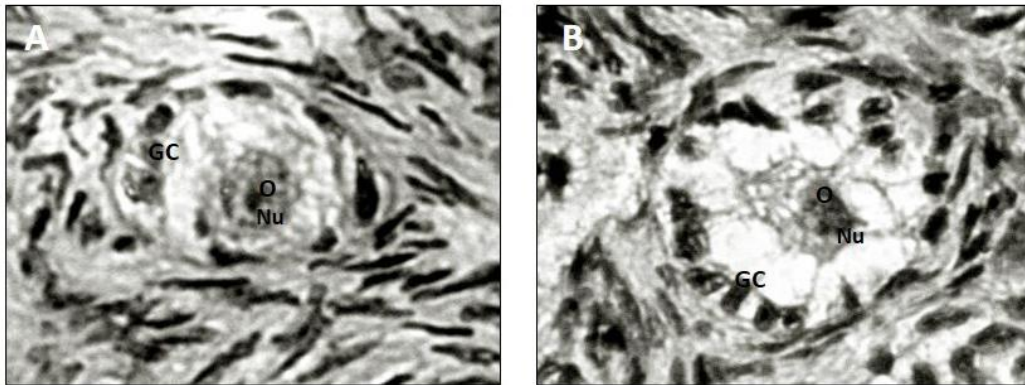


Figure 8. Histological section of uncultured tissue after staining with hematoxylin and eosin (H&E), showing a normal follicle (A) and a degenerated follicle (B). O, oocyte; Nu, nucleus; GC, granulosa cells (original magnification $\times 400$).

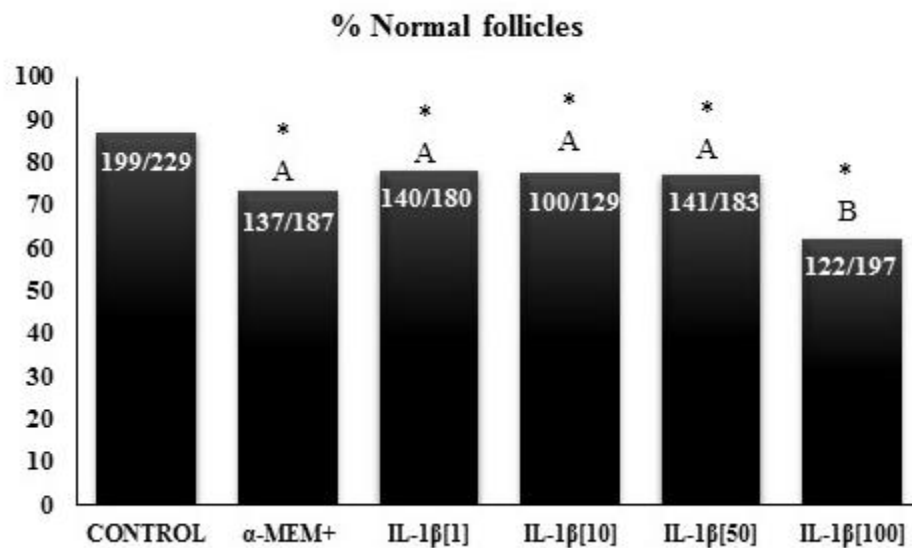


Figure 9. Percentage (mean \pm SEM) of morphologically normal follicles in uncultured control tissue (day 0), and in tissue cultured for 6 days in medium containing IL-1 β . *Differs significantly from fresh control follicles. A,B Differences of all the treatments with IL[100] ($P < 0.05$).

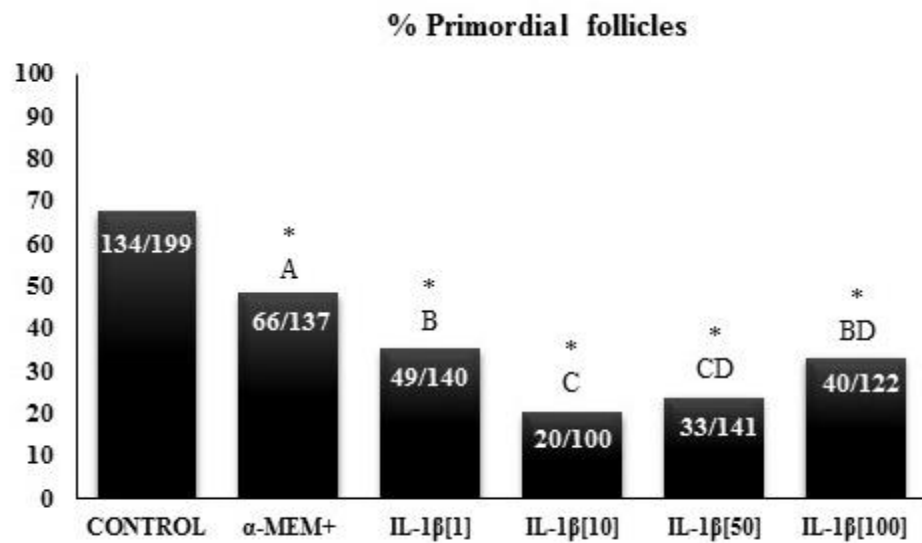


Figure 10. Percentage (mean \pm SEM) of primordial follicles in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in medium containing IL-1 β . *Differs significantly from control; Capital letters represent significant differences among cultivated treatments ($P < 0.05$).

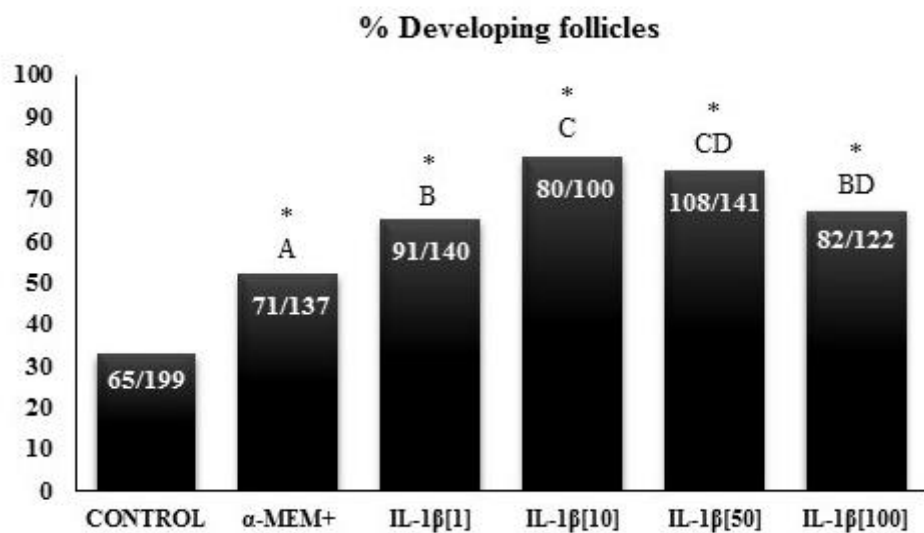


Figure 11. Percentage (mean \pm SEM) of developing follicles in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in medium containing IL-1 β . *Differs significantly from control (uncultured follicles). Capital letters represent significant differences among cultivated treatments ($P < 0.05$).

8.CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ As proteínas para os membros do sistema interleucina 1 são expressas em diferentes compartimentos foliculares em ovários bovinos.
- ✓ De um modo geral, há uma tendência de aumento na expressão do sistema IL-1 à medida em que o folículo se desenvolve.
- ✓ A IL-1 β (10 ou 50 ng/mL) contribui para a manutenção da porcentagem de folículos normais e promove a ativação dos folículos primordiais bovinos durante o cultivo de tecido ovariano *in vitro*.

9. PERSPECTIVAS

As informações obtidas neste trabalho poderão ser utilizadas para aperfeiçoar a elaboração de meios de cultivo capazes de propiciar ótimas condições para um completo crescimento folicular durante a fase pré-antral, preservando a viabilidade destas células em um longo período de cultivo. Estudos adicionais sobre a interação da IL-1 β com outras substâncias (hormônios e fatores de crescimento) são necessários para uma melhor compreensão da foliculogênese na espécie bovina. Além disso, é necessário a avaliação dos efeitos da IL-1 β no cultivo de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como durante a maturação oocitária.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABID, M. R.; GUO, S.; MINAMI, T.; SPOKES, K. C.; UEKI, K.; SKURK, C.; WALSH, K.; AIRD, W. C. Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 2, p. 294–300, 2004.
- ADASHI, E. Y. Do cytokines play a role in the regulation of ovarian function? **Prog Neuro Endocrinol Immunol**, v. 3, p. 11-17, 1990a.
- ADASHI, E. Y. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of residente ovarian cells of the white blood cell series. **Endocrine Reviews**, v. 11, p. 454 – 464, 1990b.
- ADASHI, E. Y.; RESNICK, C. E.; HERNANDEZ, E. R.; HURWITZ, A.; ROSENFELD, R. G. Follicle-stimulating hormone inhibits the constitutive release of insulin-like growth factor binding proteins by cultured rat ovarian granulosa cells. **Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 1305–1307, 1990c.
- ALBERTINI, D. F.; BARRETT, S. L. Oocyte-somatic cell communication. **Reproduction Supplement**, v. 61, n. 3, p. 49–54, 2003.
- ALMEIDA, A. P.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ARAÚJO, V. R.; COSTA, S. L.; CHAVES, R. N.; LOPES, C. A.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; CAMPELLO, C. C.; JUNIOR, J. B.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of sequential medium with fibroblast growth factor-10 and follicle stimulating hormone on *in vitro* development of goat preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 152, p. 32-38. 2015.
- ALVES, N. G.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D. Atividade ovariana em fêmeas bovinas da raça holandesa e mestiças Holandês x Zebu, durante dois ciclos estrais normais consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 627-634. 2002.
- ANDRADE, E. R.; MARCONDES SENEDA, M.; ALFIERI, A. A.; de OLIVEIRA, J. A.; BRACARENSE, FREDERICO RODRIGUES LOUREIRO BRACARENSE, A. P.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1104-1113, 2005.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: AGRA - FNP, 369p., 2013.
- ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; MAGALHÃES, D. M.; SILVA, G. M.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Effect of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 305-310, 2010.
- AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 5, p. 1445-1451, 1991.
- AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist: discovery, structure and properties. **Progress in Growth Factor Research**, v. 2, n. 4, p. 193–205, 1990.

AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 20–38, 2008.

BACHELOT, A.; MONGET, P.; IMBERT-BOLLORÉ, P.; COSHIGANO, K.; KOPCHICK, J. J.; KELLY, P. A.; BINART, N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 4104–4112, 2002.

BAILLY, S.; FERRUA, B.; FAY, M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Paraformaldehyde fixation of LPS-stimulated human monocytes: technical parameters permitting the study of membrane IL-1 activity. **European Cytokine Network**, v. 1, n. 1, p. 47–51, 1990.

BALAKRISHNAN, V.S; JABER, B. L.; NATOV, S. N.; CENDOROGLO, M.; KING, A. J.; SCHMID, C. H.; PEREIRA, B. J. Interleukin-1 receptor antagonist synthesis by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 54, n. 6, p. 2106–2112, 1998.

BAO, S.; WANG, Y.; SWEENEY, P.; CHAUDHURI, A.; DOSEFF, A. I.; MARSH, C. B.; KNOELL, D. L. Keratinocyte growth factor induces Akt kinase activity and inhibits Fas-mediated apoptosis in A549 lung epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 288, n. 1, p. 36–42, 2005.

BARAK, V.; YANAI, P.; TREVERS, A. J.; ROISMAN, I.; SIMON, A.; LAUFER, N. Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 58, p. 719–725, 1992.

BARATTA, M.; BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; TAMANINI, C. Effects of interleukin-1 beta fragment (163-171) on progesterone and estradiol-17 beta release by bovine granulosa cells from different size follicles. **Regulatory Peptides**, v. 67, n. 3, p. 187–194, 1996.

BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, p. 9–22, 1995.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISITIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1531–1547, 1997.

BASINI, G.; BARATTA, M.; BUSSOLATI, S.; TAMANINI, C. Interleukin-1 beta fragment (163-171) modulates bovine granulosa cell proliferation *in vitro*: dependence on size of follicle. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 2, p. 139–153, 1998.

BEN-AMI, I.; FREIMANN, S.; ARMON, L.; DANTES, A.; STRASSBURGER, D.; FRIEDLER, S.; RAZIEL, A.; SEGER R. RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, n. 10, p. 593–599, 2006.

BEN-SHLOMO, I.; ADASHI, E. Y. Interleukin-1 as a mediator of the ovulatory sequence: evidence for a meaningful role of cytokines in ovarian physiology. **Current Science**, v. 1, p. 187–192, 1994.

BEN-SHLOMO, I.; KOKIA, E.; JACKSON, M. J.; ADASHI, E. Y.; PAYNE, D. W. Interleukin-1 β Stimulates Nitrite Production in the Rat Ovary: Evidence for Heterologous Cell-Cell Interaction and for Insulin-Mediated Regulation of the Inducible Isoform of Nitric Oxide Synthase. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 310-318, 1994.

BEST, C. L.; HILL, J. A. Interleukin-1 alpha and -beta modulation of luteinized human granulosa cell oestrogen and progesterone biosynthesis. **Human Reproduction**, v. 10, n. 12, p. 3206-3210, 1995.

BIRD, S.; ZOU, J.; WANG, T.; MUNDAY, B.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, C. J. Evolution of interleukin-1beta. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 6, p. 483-502, 2002.

BORNSTEIN, S. R.; RUTKOWSKI, H.; VREZAS, I. Cytokines and steroidogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, n. 1-2, p. 135-141, 2004.

BRÄNNSTRÖM, M. Potential role of cytokines in ovarian physiology: the case for interleukin-1. In: Leung PCK, Adash EY, editors. The ovary. 2nd ed. Amsterdam: **Elsevier-Academic Press**, p. 261-171, 2004.

BRÄNNSTRÖM, M.; MAYRHOFER, G.; ROBERTSON, S. A. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 2, p. 277-286, 1993.

BRÄNNSTRÖM, M.; NORMAN, R. J.; SEAMARK, R. F.; ROBERTSON, S. A. Rat ovary produces cytokines during ovulation. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 1, p. 88-94, 1994.

BRÄNNSTRÖM, M.; PASCOE, V.; NORMAN, R. J.; McCLURE, N. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. **Fertility and Sterility**, v. 61, n. 3, p. 488-495, 1994.

BRÄNNSTRÖM, M.; WANG, L.; NORMAN, R. J. Ovulatory effect of interleukin-1 beta on the perfused rat ovary. **Endocrinology**, v. 132, n. 1, p. 399-404, 1993b.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; BÃO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 679-687, 2009.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; BÃO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction Fertility and Development**, v. 21, p. 679-687, 2009.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; CAMPELLO, C.

C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Vasoactive intestinal peptide improves the survival and development of caprine preantral follicles after *in vitro* tissue culture. **Cells, Tissues, Organs**, v. 191, n. 5, p. 414-421, 2010.

CAHILL, L. P.; MARIANA, J. C.; MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, n. 1, p. 27-36, 1979.

CAHILL, L. P.; MAULÉON, P. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, n. 1, p. 201-206, 1981.

CAILLAUD, M.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. *In vivo* effect of interleukin-1beta and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 26, 2005.

CARLBERG, M.; NEJATY, J.; FRÖYSA, B.; GUAN, Y.; SÖDER, O.; BERGQVIST, A. Elevated expression of tumor necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. **Human Reproduction**, v. 15, n. 6, p. 1250-1255, 2000.

CASADIO, R.; FRIGIMELICA, E.; BOSSÙ, P.; NEUMANN, D.; MARTIN, M. U.; TAGLIABUE, A.; BORASCHI, D. Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. **FEBS Letters**, v. 499, n. 1-2, p. 65-68, 2001.

CASTILHO, C.; GAMBINI, A. L. G.; FERNANDES, P.; TRINCA, L. A.; TEIXEIRA, A. B.; BARROS, C. M. Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone agonist, prostaglandin F2 α and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 91-101, 2000.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; ALMEIDA, A. P.; CUNHA, R. M. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BAO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-State level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 3, p. 231-240, 2010.

CHANG, R. J.; GOUGEON, A.; ERICKSON, G. F. Evidence for a neutrophil-interleukin-8 system in human folliculogenesis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, n. 4, p. 650-657, 1998.

CHANG, Y.; WANG, J.; LU, X.; THEWKE, D. P.; MASON, R. J. KGF induces lipogenic genes through a PI3K and JNK/SREBP-1 pathway in H292 cells. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 12, p. 2624-2635, 2005.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; CORREIA, J. C.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; BÁO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 5, p. 640-647, 2008.

CHUN, S. Y.; EISENHAUER, K. M.; KUBO, M.; HSUEH, A.J. Interleukin-1 β Suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. **Endocrinology**, v. 136, n. 7, p. 3120–3127, 1995.

CHUN, S. Y.; EISENHAUER, K. M.; KUBO, M.; HSUEH, A. J. Interleukin-1 β suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. **Endocrinology**, v. 136, n. 7, p. 3120–3127, 1995.

CHUN, S. Y.; EISENHAUER, K. M.; MINAMI, S.; BILLIG, H.; PERLAS, E.; HSUEH, A. J. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1447–1456, 1996.

CONTI, M. Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1653-1661, 2002.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Review: *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 1, p. 3-9, 2001.

DE LOS SANTOS, M. J.; ANDERSON, D. J.; RACOWSKY, C.; SIMÓN, C.; HILL, J. A. Expression of interleukin-1 system genes in human gametes. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1419–1424, 1998.

D'ETTORRE, C.; DE CHIARA, G.; CASADEI, R.; BORASCHI, D.; TAGLIABUE, A. Functional epitope mapping of human interleukin-1 beta by surface plasmon resonance. **European Cytokine Network**, v. 8, n. 2, p. 161-171, 1997.

DEYERLE, K. L.; SIMS, J. E.; DOWER, S. K.; BOTHWELL, M. A. Pattern of IL-1 receptor gene expression suggests role in noninflammatory processes. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 5, p. 1657-1665, 1992.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.

DINARELLO, C. A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **The Journal of the Federation of America Societies for Experimental Biology**, v. 8, n. 15, p. 1314–1325, 1994.

DINARELLO, C. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. **International Reviews of Immunology**, v. 16, n. 5-6, p. 457–499, 1998.

DINARELLO, C.A. Biology of interleukin 1. **The Journal of the Federation of America Societies for Experimental Biology**, v. 2, n. 2, p. 108-115, 1988.

DOWER, S. K.; KRONHEIM, S. R.; MARCH, C. J.; CONLON, P. J.; HOPP, T. P.; GILLIS, S.; URDAL, D. L. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 2, p. 501–515, 1985.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 1211-1239, 2001.

DUNN, E.; SIMS, J. E.; NICKLIN, M. J.; O'NEILL, L. A. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. **Trends Immunology**, v. 22, n. 10, p. 533-536, 2001.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 159, n. 1-2, p. 1-5, 2000.

ENDRES, S.; VAN DER MEER, J. W. M.; DINARELLO, C.A. Interleukin 1 and the pathogenesis of fever. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 17, n. 6, p. 469-474, 1987.

ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews. Genetics**, v. 7, n. 8, p. 606-619, 2006.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 4, p. 976-984, 1997.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 11, n. 1, p. 97-105, 1966b.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v. 25, n. 3, p. 800-805, 1966a.

ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 555-560, 1976.

ESPEY, L. L. Ovulation as an Inflammatory Reaction – A Hypothesis. **Biology of Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 73–106, 1980.

FALKOFF, R. J.; MURAGUCHI, A.; HONG, J. X.; BUTLER, J. L.; DINARELLO, C. A.; FAUCI, A. S. The effects of interleukin 1 on human B cell activation and proliferation. **Journal of Immunology**, v. 131, n. 3, p. 801-805, 1983.

FAN, H. Y.; LIU, Z.; SHIMADA, M.; STERNECK, E.; JOHNSON, P. F.; HEDRICK S. M.; RICHARDS, J. S. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 938-941, 2009.

FARBER, J. L: Biology of disease: membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Laboratory Investigation**, v. 47, n. 2, p. 114-123, 1982.

FIELD, S. L.; DASGUPTA, T.; CUMMINGS, M.; ORSI, N. M. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 4, p. 284-314, 2014.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonsalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 1. ed. São Paulo: Varela editor e livraria ltda, p. 227-260, 2002.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2. ed. São Paulo, SP: Roca, p. 303-327, 2008.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 53-60, 2000.

FUKUOKA, M.; YASUDA, K.; TAI, S.; TAKAKURA, K.; MORI, T. Interleukin-1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in cultures of porcine granulosa cells. **Endocrinology**, v. 124, n. 2, p. 884-890, 1989.

GAMBINI, A. L. G.; MOREIRA, M. B. P.; CASTILHO, C.; BARROS, C. M. Dinâmica folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, p. 201-210, 1998.

GÉRARD, N.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GOUDET, G.; LALMANACH, A. C. The interleukin-1 system and female reproduction. **The Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 2, p. 203–212, 2004.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; KOT, K.; MEIRA, C.; BERGFELT, D. F. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 524-529, 2003.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

GOUGEON, A. The early stages follicular growth. In: TROUNSON, A. O, GSODEN, R. G. (Ed.). *Biology and pathology of the oocyte*, New York: Cambridge University Press, p. 29-43, 2003.

GREENFEDER S. A.; NUNES P.; KWEE L.; LABOW M.; CHIZZONITE R. A.; JU, G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 23, p. 13757-13765, 1995.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, 2000.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª. ed., São Paulo: Manole, p. 13-29, 2004.

HANNUM, C. H.; WILCOX, C. J.; AREND, W. P.; JOSLIN, F. G.; DRIPPS, D. J.; HEIMDAL, P. L.; ARMES, L. G., SOMMER, A.; EISENBERG, S. P.; THOMPSON, R. C. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. **Nature**, v. 343, p. 336-340, 1990.

HARTSHORNE, G. M.; SARGENT, I. L.; BARLOW, D. H. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. **Human Reproduction**, v. 9, n. 6, p. 1003-1012, 1994.

HSUEH, A. J. W.; ADASHI, E. Y.; JONES, P. B. C.; WELSH, T. H., Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 76-127, 1984.

HURWITZ, A.; ADASHI, E. Y. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 84, n. 1-2, p. 19-23, 1992.

HURWITZ, A.; LOUKIDES, J.; RICCIARELLI, E.; BOTERO, L.; KATZ, E.; McALLISTER, J. M.; GARCIA, J. E.; ROHAN, R.; ADASHI, E. Y.; HERNANDEZ, E. R. Human intraovarian interleukin-1 (IL-1) system: highly compartmentalized and hormonally dependent regulation of the genes encoding IL-1, its receptor, and its receptor antagonist. **Journal of Clinical Investigation**, v. 89, n. 6, p. 1746-1754, 1992.

HURWITZ, A.; RICCIARELLI, E.; BOTERO, L.; ROHAN, R. M.; HERNANDEZ, E. R.; ADASHI, E. Y. Endocrine-and autocrine-mediated regulation of rat ovarian (theca-interstitial) interleukin-1 gene expression: gonadotropin-dependent preovulatory acquisition **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3427-3429, 1991a.

INGMAN, W. V.; JONES, R. L. Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 179-192, 2008.

JENSEN, L. E.; MUZIO, M.; MANTOVANI, A.; WHITEHEAD, A. S. IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 5277-5286, 2000.

JOHN, G. B.; GALLARDO, T. D.; SHIRLEY, L. J.; CASTRILLON, D. H. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Developmental Biology**, v. 321, n. 1, p. 197-204, 2008.

JOHN, G. B.; SHIDLER, M. J.; BESMER, P.; CASTRILLON, D. H. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. **Developmental Biology**, v. 331, n. 2, p. 292-299, 2009.

KARAKJI, E. G.; TSANG, B. K. Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1302-1310, 1995d.

KEITA, M.; AINMELK, Y.; PELMUS, M.; BESSETTE, P.; ARIS, A. Endometrioid ovarian cancer and endometriotic cells exhibit the same alteration in the expression of interleukin-1 receptor II: to a link between endometriosis and endometrioid ovarian cancer. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 37, n. 2, p. 99-107, 2011.

KEITA, M.; BESSETTE, P.; PELMUS, M.; AINMELK, Y.; ARIS, A. Expression of interleukin-1 (IL-1) ligands system in the most common endometriosis-associated ovarian cancer subtypes. **Journal of Ovarian Research**, v. 3, n. 3, p. 1-8, 2010.

KIDDER, G. M.; VANDERHYDEN, B. C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 399-413, 2010.

KOL, S.; DONESKY, B. W.; RUUTIAINEN-ALTMAN, K.; BEN-SHLOMO, I.; IRAHARA, M.; ANDO, M.; ROHAN, R. M.; ADASHI, E. Y. Ovarian interleukin-1 receptor antagonist in rats: gene expression, cellular localization, cyclic variation, and hormonal regulation of a potential determinant of interleukin-1 action. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 274-282, 1999a.

KOL, S.; RUUTIAINEN-ALTMAN, K.; SCHERZER, W. J.; BEN-SHLOMO, I.; ANDO, M.; ROHAN, R. M.; ADASHI, E. Y. The rat intraovarian interleukin (IL)-1 system: Cellular localization, cyclic variation and hormonal regulation of IL-1beta and of the type I and type II IL-1 receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 149, n. 1-2, p. 115-128, 1999b.

KOL, S.; WONG, K. H.; ANDO, M.; BEN-SHLOMO, I.; ADASHI, E. Y. Rat ovarian interleukin-1 alpha: interleukin-1-dependent *in vitro* expression. **Endocrine**, v. 11, n. 3, p. 269-275, 1999c.

KOMAR, C. M.; BERNDTSON, A. K.; EVANS, A. C.; FORTUNE, J. E. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17alpha-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1797-1805, 2001.

KORHERR, C.; HOFMEISTER, R.; WESCHE, H.; FALK, W. A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 262-267, 1997.

KURT-JONES, E. A.; BELLER, D. I.; MIZEL, S. B.; UNANUE, E. R. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 82, n. 4, p. 1204–1208, 1985.

LEVI-SETTI, P. E.; CAVAGANA, M.; BAGGIANI, A.; ZANONNI, E.; COLOMBO, G. V.; LIPRANDI, V. FSH and LH together in ovarian stimulation. **Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 115, p. 34-39, 2004.

LI, Q.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; BETTEGOWDA, A.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. **Journal of Endocrinology**, v. 192, n. 3, p. 473-483, 2007.

LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; BRUNO, J. B.; TENÓRIO, S. B.; MARTINS, F. S.; CUNHA, L. D.; NAME, K. P.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles. **Cells, Tissues, Organs**, v. 191, n. 3, p. 240-247, 2010.

LIU, H. C.; HE, Z.; ROSENWAKS, Z. *In vitro* culture and *in vitro* maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. **Fertility and Sterility**, v. 77, n. 2, p. 373-383, 2002.

LIU, J.; CARRIÈRE, P. D.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1524-1531, 1997.

LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 6, p. 1527-1532, 1998.

LIU, L.; RAJAREDDY, S.; REDDY, P.; DU, C.; JAGARLAMUDI, K.; SHEN, Y.; GUNNARSSON, D.; SELSTAM, G.; BOMAN, A.; LIU, K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. **Development**, v. 134, n. 1, p. 199-209, 2007a.

LIU, L.; RAJAREDDY, S.; REDDY, P.; JAGARLAMUDI, K.; DU, C.; SHEN, Y.; GUO, Y.; BOMAN, K.; LUNDIN, E.; OTTANDER, U.; GUNNAR, S.; KUI, L. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase-3 by soluble kit ligand in mouse oocytes during early follicular development. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 38, n. 1-2, p. 137-146, 2007b.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MACHELON, V.; EMILIE, D. Production of ovarian cytokines and their role i. **European Cytokine Network Synthèses**, v. 8, n. 2, p. 137-143, 1997.

MARSH, J. M. The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 30-53, 1976.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C. M. G.; LIMA-VERDE, I. B.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 728-736, 2010.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36-49, 2008.

MARTORIATI, A.; CAILLAUD, M.; GOUDET, G.; GÉRARD, N. Inhibition of *in vitro* maturation of equine oocytes by interleukin 1 beta via specific IL-1 receptors. **Reproduction**, v. 126, n. 4, p. 509-515, 2003a.

MARTORIATI, A.; LALMANACH, A. C.; GOUDET, G.; GÉRARD, N. Expression of interleukin-1 (IL-1) system genes in equine cumulus-oocyte complexes and influence of IL-1beta during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 2, p. 630–636, 2002.

MARTORIATI, A.; NADINE GÉRARD. Interleukin-1 (IL-1) system gene expression in granulosa cells: kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 42, p. 1-10, 2003c.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; MAIA, J. E. JR.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v.15, n. 2, p.173-182, 2007.

MATSUSHIMA, K.; AKAHOSHI, T.; YAMADA, M.; FURUTANI, Y.; OPPENHEIM, J. J. Properties of a specific interleukin 1 (IL-1) receptor on human Epstein Barr virus-transformed B lymphocytes: identity of the receptor for IL 1-alpha and IL 1-beta. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 12, p. 4496–4502, 1986.

MATTIOLI, M. Transduction mechanisms for gonadotrophin-induced oocyte maturation in mammals. **Zygote**, v. 2, n. 4, 347–349, 1994.

McMAHAN, C. J.; SLACK, J. L.; MOSLEY, B.; COSMAN, D.; LUPTON, S. D.; BRUNTON, L. L.; GRUBIN, C. E.; WIGNALL, J. M.; JENKINS, N. A.; BRANNAN, C. I.; COPELAND, N. G.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M., CANNIZZARRO, L. A.; BENJAMIN, D.; DOWER, S. K.; SPRIGGS, M. K.; SIMS, J. E. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. **The EMBO Journal**, v. 10 n. 10 p. 2821-2832, 1991.

MIHM, M.; EVANS, A. C. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and introvarian events in cows, mares and women. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, Suppl. 2, p. 48-56, 2008.

MIHM, M.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. L. ; IRELAND, J. J.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in the selection of the dominant follicle in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1328-1337, 1997.

MIZEL, S. B. Interleukin 1 and T cell activation. **Immunological Reviews**, v. 63, p. 51-72, 1982.

MURAYAMA, C.; KAJI A.; MIYAUCHI, K.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A.; SHIMIZU, T. Effect of VEGF (vascular endothelial growth factor) on expression of IL-8 (interleukin-8), IL-1beta and their receptors in bovine theca cells. **Cell Biology International**, v. 34, n. 5, p. 531-536, 2010.

MURPHY, M. G.; ENRIGHT, W. J.; CROWE, M. A.; McCONNELL, K.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 333-338, 1991.

NAGAO, S.; MURAO, K.; IMACHI, H.; CAO, W. M.; YU, X.; LI, J.; MATSUMOTO, K.; NISHIUCHI, T.; AHMED, R. A.; WONG, N. C.; UEDA, K.; ISHIDA, T. Platelet derived growth factor regulates ABCA1 expression in vascular smooth muscle cells. **FEBS Letters**, v. 580, n. 18, p. 4371-4376, 2006.

NAKAE, S.; ASANO, M.; HORAI, R.; IWAKURA, Y. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. **Immunology**, v. 104, n. 4, p. 402-409, 2001.

NEVES, M. M.; MARQUES JR., A. P; SANTANA, C. V; LIMA, F. P. C.; ZAMBRANO, W. J. Características de ovários de fêmeas zebu (*Bos taurus indicus*), colhidos em abatedouros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, 2002.

NILSSON, E.; ZHANG, B.; SKINNER, M. K. Gene bionetworks that regulate ovarian primordial follicle assembly. **BMC Genomics**, v. 14, p. 496, 2013.

NÓBREGA Jr., J. E.; ROSSETTO, R.; MATOS, M. H. T.; CHAVES, R. N.; MAGALHÃES, D. M.; LIMA-VERDE, I. B.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C. Esfingosina 1-fosfato promove ativação de folículos pré-antrais de caprinos *in vitro* (Sphingosine 1-phosphate promotes activation of aprine preantral follicle *in vitro*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, 2014.

O'NEILL, L. A.; GREENE, C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, n. 6, p. 650-657, 1998.

ORSI, N. M.; EKBOTE, U. V.; WALKER, J. J.; GOPICHANDRAN, N. Uterine and serum cytokine arrays in the mouse during estrus. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 3-4, p. 301-310, 2007.

OTANI, H.; YAMOTO, M.; FUJINAGA, H.; NAKANO, R. Presence and localization of endothelin receptor in the rat ovary and its regulation by pituitary gonadotropins. **European Journal of Endocrinology/European Federation of Endocrine Societies**, v. 135, n. 4, p. 449–454, 1996.

PANIGONE, S. HSIEH, M.; FU, M.; PERSANI, L.; CONTI, M. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 4, p. 924-936, 2008.

PARK, J. Y.; SU, Y. Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S. L. CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682-684, 2004.

PARKER, K. I. ROBERTSON, D. M; GROOME, N. P.; MACMILLAN, K. L. Plasma concentrations of inhibin a and follicle- stimulating hormone differ between cows with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 822- 828, 2003.

PAVÃO, D. L. Avaliação da citotoxicidade e interferência de Ateleia glazioviana na interação do Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro*. 60 f. Mestrado (Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, São Paulo, 2009.

PENG, X. R.; HSUEH, A. J.; LAPOLT, P. S.; BJERSING, L.; NY, T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3200-3207, 1991.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 16, n. 3, p. 271-278, 1976.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, n. 6, p. 1193-1210, 2001.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 21-37, 1988.

PORTELA, A. M. L. R.; RIBEIRO, R. P.; COSTA, J. J. N.; ROSSI, R. O. D. S.; PASSOS, J. R. S.; VASCONCELOS, G. L.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; SARAIVA, M. V. A.; van den HURK, R.; SILVA, J. R. V. Effects of different concentrations of concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression. **Small Ruminant Research**, v. 116, n. 2-3, p. 183-191, 2014.

RACHID, M. A.; VASCONCELOS, A. C.; NUNES, V. A. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histopmorphometry of the bursa of Fabricius. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 592-598, 2000.

RAHBK, U. L.; DISSING, S.; THOMASSEN, C.; HANSEN, A. J.; TRITSARIS, K. Nerve growth factor activates aorta endothelial cells causing PI3K/Akt- and ERK dependent

migration. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 450, n. 5, p. 355-361, 2005.

REBOUÇAS, E. L.; COSTA, J. J.; PASSOS, M. J.; SILVA, A. W.; ROSSI, R. O.; van den Hurk, R.; SILVA, J. R. Expression levels of mRNA for insulin-like growth factors 1 and 2, IGF receptors and IGF binding proteins in *in vivo* and *in vitro* grown bovine follicles. **Zygote**, v. 22, n. 4, p. 521-532, 2014.

REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, K.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HÄMÄLÄINEN, T.; PENG, S. L.; LAN, Z. J.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI, I.; LIU, K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611-613, 2008.

RIBEIRO, R. P.; PORTELA, A. M.; SILVA, A. W.; COSTA, J. J.; PASSOS, J. R.; CUNHA, E. V.; SOUZA, G. B.; SARAIVA, M. V.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; van den HURK, R.; SILVA, J. R. Effects of jacalin and follicle-stimulating hormone on *in vitro* goat primordial follicle activation, survival and gene expression. **Zygote**, v. 29, p. 1-13, 2014.

RICHARD, F. J.; SIRARD, M. A. Effect of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 22-28, 1996.

RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v. 60, p. 51-89, 1980.

RICHARDS, J. S. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 2, p. 209-218, 2001.

RICHARDS, J. S. Sounding the alarm – does induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 control the mammalian ovulatory clock? **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4047-4048, 1997.

ROBERT, C.; GAGNÉ, D.; LUSSIER, J. G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F. L.; SIRARD, M. A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v. 125, n. 3, p. 437-446, 2003.

ROBY, K. F.; TERRANOVA, P. F. Effects of tumor necrosis factor-alpha *in vitro* on steroidogenesis of healthy and atretic follicles of the rat: theca as a target. **Endocrinology**, v. 126, n. 5, p. 2711-2718, 1990.

ROBY, K. F.; TERRANOVA, P. F. Localization of tumor necrosis factor (TNF) in the rat and bovine ovary using immunohistochemistry and cell blot: evidence for granulosa production. In: A. N. Hirshfield (ed.), *Growth Factors and the Ovary*, © Plenum Press, **New York**, p. 273-278, 1989.

ROUX-LOMBARD, P. The interleukin-1 family. **European Cytokine Network**, v. 9, n. 4, p. 565-576, 1998.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.

RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 3, p. 289-312, 2007.

SALAMONSEN, L. A.; HANNAN, N. J.; DIMITRIADIS, E. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 6, p. 437-444, 2007.

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T, CAMPELLO, C. C, FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 12: 1135-1143, 2010.

SARTORI, R.; FRICKE P. M.; FERREIRA, J. C.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988.

SCARAMUZZI, R. J.; ADAMS, N. R.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; FINDLAY, J. K.; HENDERSON, K. M.; MARTIN, G. B.; McNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; TSONIS, C. G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 459-478, 1993.

SCHERZER, W. J.; RUUTIAINEN-ALTMAN, K. S.; PUTOWSKI, L. T.; KOL, S.; ADASHI, E. Y, ROHAN, R. M. Detection and *in vivo* hormonal regulation of rat ovarian type I and type II interleukin-I receptor mRNAs: increased expression during the periovulatory period. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 3, n. 3, p. 131-139, 1996.

SERAPIÃO, R. V. Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* cultivados em meio livre de soro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2008.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J. S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 6, p. 1352-1365, 2006.

SHIMIZU, T.; KAJI, A.; MURAYAMA, C.; MAGATA, F.; SHIRASUNA, K.; WAKAMIYA, K.; OKUDA, K.; MIYAMOTO, A. Effects of interleukin-8 on estradiol and progesterone production by bovine granulosa cells from large follicles and progesterone production by luteinizing granulosa cells in culture. **Cytokine**, v. 57, p. 175-181, 2012.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; FIGUEIREDO, J. R. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v. 12, n. 2, p. 105-117, 2002.

SILVA, J. R. V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 113-125, 2006a.

SILVA, J. R. V.; van den HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, 2004b.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1051-1057, 2011.

SIMÓN, C.; FRANCES, A.; PIQUETTE, G.; POLAN, M. L. Immunohistochemical localization of the interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation, and luteinization. **Biology of Reproduction**, v. 50, n.2, p. 449-457, 1994.

SIMS, J. E.; GAYLE, M. A.; SLACK J. L.; ALDERSON, M. R.; BIRD, T. A.; GIRI, J. G.; COLOTTA, F.; RE, F.; MANTOVANI, A.; SHANEBECK, K. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 13, p. 6155–6159, 1993b.

SIROIS, J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. **Endocrinology**, v. 135, n. 3, p. 841-848, 1994.

SIROTKIN, A. V. Cytokines: signalling molecules controlling ovarian functions. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 6, p. 857-861, 2011.

SPICER, L. J, ALPIZAR, E. Effects of cytokines on FSH-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 25-34, 1994.

SRINIVASAN, S.; ANITHA, M.; MWANGI, S.; HEUCKEROTH, R. O. Enteric neuroblasts require the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt/Forkhead pathway for GDNF-stimulated survival. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 29, n. 1, p. 107-119, 2005.

TAHER, T. E.; DERKSEN, P. W.; DE BOER, O. J.; SPAARGAREN, M.; TEELING, P.; VAN DER WAL, A. C.; PALS, S. T. Hepatocyte growth factor triggers signaling cascades mediating vascular smooth muscle cell migration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 1, p. 80-86, 2002.

TAKEHARA, Y.; DHARMARAJAN, A. M.; KAUFMAN, G.; WALLACH, E. E. Effect of interleukin-1 beta on ovulation in the *in vitro* perfused rabbit ovary. **Endocrinology**, v. 134, n. 4, p. 1788–1793, 1994.

TERRANOVA, P. F.; RICE, V. M. Review: cytokine involvement in ovarian processes. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, p. 50–63, 1997.

THORNBERRY, N. A.; BULL, H. G.; CALAYCAY, J. R.; CHAPMAN, K. T.; HOWARD, A. D.; KOSTURA, M. J.; MILLER, D. K.; MOLINEAUS, S. M.; WEIDNER, J. R.; AUNIS, J., et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. **Nature**, v. 356, n. 6372, p. 768-774, 1992.

TISDALL, D. J.; WATANABE, K.; HUDSON, N. L.; SMITH, P.; McNATTY, K. P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 3, p. 273-281, 1995.

TONELLOTTO DOS SANTOS, J.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G.; SIQUEIRA, L. C.; DE OLIVEIRA, J. F.; SANTOS, R. A.; REIS, A. M.; GONÇALVES, P. B. D. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of the Renin-Angiotensin Aldosterone System: JRAAS**, v. 13, n. 1, p. 91-98, 2012.

TRUNDLEY, A.; MOFFETT, A. Human uterine leukocytes and pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 63, n. 1, p. 1-12, 2004.

URI-BELAPOLSKY, S.; SHAISH, A.; ELIYAHU, E.; GROSSMAN, H.; LEVI, M.; CHUDERLAND, D.; NINIO-MANY, L.; HASKY, N.; SHASHAR, D.; ALMOG, T.; KANDEL-KFIR, M.; HARATS, D.; SHALGI, R.; KAMARI, Y. Interleukin-1 deficiency prolongs ovarian lifespan in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12492-12497, 2014.

VAN DEN HURK, R.; DIJKSTRA, G.; HULSHOF, S. C. J.; Vos, P. L. A. M. Micromorphology of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis, with particular reference to atypical granulosa cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 137-142, 1994.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2005.

VAN DER HOEK, K. H.; WOODHOUSE, C. M.; BRÄNNSTRÖM, M.; NORMAN, R. J. Effects of Interleukin (IL)-6 on Luteinizing Hormone- and IL-1 I-Induced Ovulation and Steroidogenesis in the Rat Ovary. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1266-1271, 1998.

VAN TOL, H. T.; BEVERS, M. M. Theca cells and theca-cell conditioned medium inhibit the progression of FSH-induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 315–321, 1998.

VASSILIADIS, S.; RELAKIS, K.; PAPAGEORGIOU, A.; ATHANASSAKIS, I. Endometriosis and infertility: a multi-cytokine imbalance versus ovulation, fertilization and early embryo development. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 12, n. 2, p. 125–129, 2005.

VENDOLA, K. A.; ZHOU, J.; ADESANYA, O. O.; WEIL, S. J.; BONDY, C. A. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 12, p. 2622–2629, 1998.

WANG, L. J.; BRANNSTRÖM, M.; CUI, K. H.; SIMULA, A. P.; HART, R. P.; MADDOCKS, S.; NORMAN, R. J. Localisation of mRNA for interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the rat ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 11-17, 1997.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 54, p. 33-48, 1999.

WESCHE, H.; HENZEL, W. J.; SHILLINGLAW, W.; LI, S.; CAO, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 837-847, 1997.

YAMASHITA, Y.; HISHINUMA, M.; SHIMADA, M. Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during *in vitro* maturation of porcine COCs. **Journal of Ovarian Research**, v. 2, p. 20, 2009.

YAMASHITA, Y.; KAWASHIMA, I.; YANAI, Y.; NISHIBORI, M.; RICHARDS, J. S.; SHIMADA, M. Hormone-induced expression of tumor necrosis factor alpha-converting enzyme / A disintegrin and metalloprotease-17 impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the epidermal growth factor receptor. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 6164-6175, 2007.

YAMASHITA, Y.; SHIMADA, M. The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 5, p. 510-514, 2012.

ZACZEK D.; HAMMOND, J.; SUEN, L.; WANDJI, S.; SERVICE, D.; BARTKE, A.; CHANDRASHEKAR, V.; COSCHIGANO, K.; KOPCHICK, J. Impact of growth hormone resistance on female reproductive function: new insights from growth hormone receptor knockout mice. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1115–1124, 2002.

ZOLTI, M.; BEN-RAFAEL, Z.; MEIROM, R.; SHEMESH, M.; BIDER, D.; MASHIACH, S.; APTE, RN. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. **Fertility and Sterility**, v. 56, n. 2, p. 265-272, 1991.