



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO EDILCARLOS DE OLIVEIRA LIMA

**INFLUÊNCIA DA INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1 β) E DO FATOR DE NECROSE
TUMORAL ALFA (TNF- α) SOBRE O CRESCIMENTO E MATURAÇÃO *IN VITRO* DE
OÓCITOS BOVINOS PROVENIENTES DE FOLÍCULOS ANTRAIS PEQUENOS**

SOBRAL – CE
2018

FRANCISCO EDILCARLOS DE OLIVEIRA LIMA

INFLUÊNCIA DA INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1 β) E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α) SOBRE O CRESCIMENTO E MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS PROVENIENTES DE FOLÍCULOS ANTRAIIS PEQUENOS

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

Orientador: José Roberto Viana Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L698i Lima, Francisco Edilcarlos de Oliveira.
Influência da interleucina 1 beta (IL-1B) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-A) sobre o crescimento e maturação in vitro de oócitos bovinos provenientes de folículos antrais pequenos / Francisco Edilcarlos de Oliveira Lima. – 2018.
91 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2018.

Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

1. maturação in vitro. 2. pequenos folículos antrais bovinos. 3. fator de necrose tumoral alfa. 4. interleucina 1 beta. 5. citocinas. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO EDILCARLOS DE OLIVEIRA LIMA

INFLUÊNCIA DA INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1 β) E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α) SOBRE O CRESCIMENTO E MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS PROVENIENTES DE FOLÍCULOS ANTRAIS PEQUENOS

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

Aprovado em: / /2018.

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA

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

Prof. Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus

À minha família, Malena, Mocinha,
Edgar e Edwilson.

AGRADECIMENTOS

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

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

À minha esposa e maior incentivadora, Malena da Silva Barros Oliveira, sempre me apoiando em momentos importantes; mostrando seu exemplo de vida, que por mais adverso que seja o nosso caminho, devemos ser persistentes e nunca desistir de nossos sonhos.

Aos meus pais Edgar Pereira Lima e Maria Mocinha de Oliveira Lima, que sempre apoiaram meu sonho com simplicidade e muito amor, onde o ser humano melhor que sou devo tudo a eles pelo tempo gasto em minha educação. Como também ao meu irmão, Francisco Edwilson Oliveira Lima, onde sempre me espelhei pelo caráter e grande homem.

Ao Prof. Dr. Jose Roberto Viana Silva, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pelo exemplo de profissional, pelos ensinamentos, pelo apoio nas dificuldades, pela paciência e pela orientação durante a escrita da dissertação e do artigo científico.

Aos professores Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar e Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva participantes da banca examinadora pelas colaborações e sugestões.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa (Renato Passos, Glaucinete Borges, Bruno, Taiã Gomes, Ellen, Lais Melo, Gisvane Lopes, Bianca, Pedro Alves, Larissa, Miguel, Dandara, Adriel Castro, Venância, Barbara, Edmundo, Wesley) pelas orientações e contribuições.

Aos meus colegas da turma de mestrado, pelo compartilhamento de ideias, distrações e reflexões.

“Aprendi que a coragem não é ausência
do medo, mas o triunfo sobre ele.”
(Nelson Mandela)

RESUMO

O objetivo desse estudo foi verificar o efeito da interleucina 1 beta (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) durante o crescimento *in vitro* de oócitos bovinos provenientes de folículos antrais pequenos (1-3 mm). Para tanto, os complexos cumulus oócitos (COCs) recuperados foram cultivados em TCM-199 sozinho ou suplementado com IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL) ou ambos IL-1 β e TNF- α . Após 48 horas de cultivo, o diâmetro dos oócitos foi mensurado e, em seguida, os COCs foram destinados a um período de pré-maturação (pré-MIV), por 20 horas, em meio TCM-199 suplementado com 10 μ M de cilostamida. Após período de pré-maturação, metade dos COCs foi destinada a maturação *in vitro* (MIV) por 22 horas, enquanto a outra metade foi destinada à verificação da progressão meiótica por coloração de Hoechst 33342. Além disso, foi avaliada a distribuição mitocondrial de oócitos após a pré-maturação e maturação nos diferentes tratamentos, bem como oócitos oriundos de folículos crescidos *in vivo* (diâmetros ≤ 3 mm ou > 5 mm). Realizou-se também a análise da expressão de RNAm para GDF-9, c-Mos, Ciclina-1 β e H1foo após a pré-maturação *in vitro*. Para análise estatística, o teste t pareado foi usado para comparar os diâmetros dos oócitos antes e após o cultivo. ANOVA *one way* analisou o crescimento oocitário, enquanto que o teste *Kruskal-Wallis* comparou os níveis de RNAs mensageiros à expressão gênica. O teste *Chi-quadrado* foi utilizado para avaliar a progressão meiótica dos oócitos. Os resultados demonstraram que após 48 horas, houve um aumento significativo do diâmetro oocitário em todos os tratamentos. No entanto, os oócitos cultivados na presença de TNF- α ou de IL-1 β e TNF- α apresentaram maiores diâmetros quando comparados àqueles cultivados no meio controle. Com relação à distribuição mitocondrial, verificou-se uma distribuição heterogênea nos oócitos provenientes de folículos crescidos *in vivo* (> 5 mm), bem como após a pré-MIV em TCM-199 sozinho ou suplementado com TNF- α . No entanto, após a MIV, as mitocôndrias apresentavam uma distribuição heterogênea apenas no TCM-199. A respeito da expressão gênica, TNF- α , IL-1 β ou ambos não influenciaram a expressão de GDF-9, c-Mos, Ciclina-1 β e H1foo. Em conclusão, TNF- α ou ambos TNF- α e IL-1 β favoreceram o crescimento dos oócitos durante o período que antecede a pré-maturação. No entanto, estas substâncias não exercem efeitos durante a maturação de oócitos provenientes de folículos antrais pequenos.

Palavras-chave: maturação *in vitro*, pequenos folículos antrais, TNF- α , IL-1 β , citocinas, bovinos

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the effect of Interleukin 1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) during the *in vitro* growth of bovine oocytes from small antral follicles (1-3 mm). Therefore, the recovered COCs were cultured in TCM-199 alone or supplemented with IL-1 β (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) or both IL-1 β and TNF- α . After 48 hours of culture, oocyte diameter was measured and the COCs were then pre-matured (pre-MIV) for 20 hours in TCM-199 medium supplemented with 10 μ M cilostamide. After pre-maturation period, half of the COCs were submitted to matured *in vitro* (IVM) for 22 hours, while the other half was used to verify the meiotic progression by staining of Hoechst 33342. In addition, the mitochondrial distribution of oocytes was evaluated after culture in the different treatments, as well as oocytes from follicles grown *in vivo* (diameters \leq 3 mm or $>$ 5 mm). The expression of mRNA for GDF-9, c-Mos, Cyclin-1 β and H1foo was also analyzed after *in vitro* pre-maturation. For statistical analysis, paired t-test was used to compare oocyte diameters before and after culture. ANOVA one way analyzed oocyte growth, while the Kruskal-Wallis test compared levels of mesenteric RNAs to gene expression. The Chi-square test was used to evaluate the meiotic progression of oocytes. The results demonstrated that after 48 hours there was a significant increase in oocyte diameter in all treatments. However, oocytes cultured in the presence of TNF- α or IL-1 β and TNF- α showed larger diameter when compared to those cultured in the control medium. Regarding the mitochondrial distribution, a heterogeneous (pericortical) distribution was observed in oocytes from follicles grown *in vivo* ($>$ 5 mm), as well as after pre-IVM in TCM-199 alone or supplemented with TNF- α . However, after IVM, mitochondria had a heterogeneous distribution only in TCM-199. Regarding gene expression, TNF- α , IL-1 β or both did not influence the expression of GDF-9, c-Mos, Cyclin-1 β and H1foo. In conclusion, TNF- α or both TNF- α and IL-1 β favored oocyte growth during the pre-maturation period. However, these substances did not induce effects during maturation of oocytes from small antral follicles

Keywords: *in vitro* maturation, small antral follicles, TNF- α , IL-1 β , cytokines, bovines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Esquema representativo de um ovário mamífero mostrando a classificação folicular e os possíveis destinos oocitários. 26
- Figura 2. Características morfológicas dos folículos pré-antrais e antrais iniciais. 27
- Figura 3. Representação esquemática da fase de seleção folicular. 28
- Figura 4. Esquema representativo do mecanismo de retenção da meiose em oócitos. O AMPc é responsável pela ativação do PKA que, por sua vez, fosforila resíduos de serina 14 e treonina 15 da subunidade CDK1 do MPF mantendo-o inativo. O AMPc tanto é produzido no oócito, pela atividade da adenil ciclase, como é produzido nas células do cumulus e da granulosa e são transferidos para o oócito via junções *gap*. O GMPc contribui para a retenção da meiose pois inibe enzimas que hidrolizam o AMPc (fosfodiesterase 3). Essas vias de sinalizações contribuem para manter o oócito em VG (Adaptado de TRIPATHI, KUMAR & CHAUBE, 2010). 36
- Figura 5. Movimento mitocondrial. a) Esquema representativo da movimentação mitocondrial em oócitos de camundongos orquestrada pelas proteínas motoras dineína e cinesina-1. b) 1 – Tubulinas formando os centros organizadores de microtúbulos (MTOC) (vermelho); 2 - mitocôndrias (verde); e 3 – sobreposição de 1 e 2. c) Oócito fixado no momento da primeira extrusão do corpúsculo polar; 4 – Mitocôndrias coradas de verde e DNA de azul e 5 – oócito sem coloração (Adaptado de Dalton & Carroll 2013). 38
- Figura 6. Mostra a via apoptótica, clássica e alternativa do sistema TNF- α com seus receptores (TNFR1 ou TNFR2) capazes de promover transdução de sinal. A via clássica acontece através da ativação do NEMO e a via alternativa através da ativação da NIK. O TNFR1 pode desencadear apoptose pela da formação do complexo II, com a ligação do FADD

e procaspase – 8/10, e sobrevivência celular através da via clássica com a ativação da FLIP (inibidor da pro-caspase – 8/10). Contudo, o TNFR2 pode desencadear sobrevivência pela via clássica e alternativa (HAYDEN & GHOSH, 2004; RAUERT *et al.*, 2010; BAEUERLE & BALTIMORE, 1996; MICHEAU & TSCHOPP, 2003; WULLAERT *et al.*, 2007)..... 43

Figura 7. Vias de sinalização do sistema IL-1 β – (a) complexo de heterodímero do sistema IL-1 β capaz de promover transdução de sinal (via clássica pela estimulação do NEMO); (b) antagonista natural da IL-1 β (IL-1Ra) promovendo o bloqueio da transdução de sinal; (c) receptor tipo II (IL-1RII) inibindo a transdução de sinais pela pequena cadeia peptídica que não atravessa a membrana completamente..... 49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO I

- Figure 1. Mean diameter of oocytes cultured in TCM-199 alone or supplemented with IL1 β , TNF α and both IL1 β and TNF α for 0 and 48 hours. 63
- Figure 2. Average growth of oocytes cultured in TCM-199 alone or supplemented with IL1 β , TNF α and both IL1 β and TNF α for 48 hours. 63
- Figure 3. Expression of mRNA for (A) GDF-9; (B) c-Mos; (C) H1FOO; (D) Cyclin-B1 in bovine oocytes that had been grown in TCM-199 alone or supplemented with IL-1 β , TNF α and both IL-1 β and TNF α for 48 hours and pre-matured for 20 hours. 65
- Figure 4. Oocytes with different types of mitochondrial distribution. A) Oocytes from large antral follicles with heterogeneously distributed mitochondria. B) Oocytes from small antral follicles with homogeneously distributed mitochondria. Original magnification 400x. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação de níveis de RNAm e/ou efeitos de substâncias em oócitos de folículos de tamanhos diferentes em várias espécies.....	34
Tabela 2. Expressão de TNF- α e receptores de TNF- α (tipo I e tipo II) em ovários de várias espécies (Adaptado de SAKUMOTO & OKUDA, 2004).	44
Tabela 3. Intensidade relativa da coloração imuno-histoquímica para as proteínas TNF- α ; TNFR-1 e proteína TNFR-2 em folículos ovarianos bovinos (Adaptado de Silva <i>et al.</i> , 2017b).	46
Tabela 4. Intensidade relativa da coloração imuno-histoquímica para IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII e localização de mRNA para IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII em ovários de vacas (Adaptado de Passos <i>et al.</i> , 2017).	47

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1. Primer pairs used to real-time PCR.....	61
Table 2. Percentage of oocytes in germinal vesicle (GV) and resumption of meiosis after pre-maturation and <i>in-vitro</i> maturation (IVM).	64
Table 3. Mitochondrial distribution of fresh oocytes at time zero and after pre-maturation and maturation in vitro of oocytes that had been previously grown in TCM-199 alone or supplemented with IL-1 β , TNF α and both IL-1 β and TNF α for 48 hours.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilciclase
ADAMTS1	<i>Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1</i>
AMH	Hormônio antimulleriano
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AREG	Anfirregulina
ARL2	Fator 2 de ADP-ribosilação (<i>ADP-ribosylation factor-like 2</i>)
BLI	Butirolactona I
BSA	Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Células do cumulus
CDK1	Cinase dependente de ciclina 1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CE	Células endoteliais
CG	Células da granulosa
cIAP	Proteína inibidora da apoptose
CL	Corpo lúteo
CLG	Células luteais grandes
CLP	Células luteais pequenas

c-MOS	<i>Oocyte maturation factor</i> MOS
COC	Complexo cumulus-oócito
CT	Células da teca
dbcAMP	Dibutilil adenosina monofosfato cíclico
DMR	Regiões diferencialmente metiladas
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
DO	Oócito desnudo
DTT	Ditiotreitol
E2	Estradiol
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>)
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
FAPs	Folículos ovarianos antrais pequenos
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação 9
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
GPCR	Receptor de proteína G estimulatória

GRB10	Proteína 10 ligada ao receptor do fator de crescimento
GVBD	Quebra da vesícula germinativa
H1FOO	Histona específica do oócito 1
HAS2	Ácido hialurônico sintase 2
hCG	Gonadotropina coriônica humana
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
IGF2R	Receptor de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IκB	Inibidor <i>kappa</i> beta
IKK	Complexo IκB <i>Kinase</i>
IKK α	Subunidade alfa do complexo IκB <i>Kinase</i>
IKK β	Subunidade beta do complexo IκB <i>Kinase</i>
IKK γ	Subunidade gama do complexo IκB <i>Kinase</i>
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 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4

IL-8	Interleucina 8
IL-33	Interleucina 33
INH β	Inibina beta
IRAK1	Quinase do tipo 1 associada ao receptor de interleucina-1
IRAK2	Quinase do tipo 2 associada ao receptor de interleucina-1
JNK	Jun N-terminal quinase (<i>c-Jun amino-terminal kinase</i>)
K1F5B	Cinesina-1
LH	Hormônio Luteinizante
MII	Metafase II
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MATER	<i>Maternal antigen that embryos require</i>
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
MTOC	Centros organizadores de microtúbulos
MyD88	Resposta primária de diferenciação mieloide 88
NaCl	Cloreto de sódio
NEMO	NF- $\kappa\beta$ <i>essential modifier</i> (Modificador essencial de NF- $\kappa\beta$)
NF- $\kappa\beta$	Fator de transcrição <i>kappa</i> beta
NIK	Quinase indutora NF- $\kappa\beta$
NPC	Peptídeo natriurético C

NTP	Peptídeo N-terminal
OCT-4	Fator de transcrição de ligação <i>octamer</i> 4
OPU	<i>Ovum pick up</i>
p38 MAPK	p38 <i>mitogen-activated protein kinase</i> (Proteína 38 quinase ativada por mitógenos)
P4	Progesterona
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE3	Fosfodiesterase tipo 3
pH	Potencial hidrogeniônico
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína-cinase dependente de AMPc (proteína-cinase A)
PTGS2	Prostaglandina-endoperoxide sintase 2 (ciclo oxigenase 2 – COX-2)
RIP1	Proteína que interage o receptor
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA _{se}	Ribonuclease
TCM-199	Tissue culture medium (Meio de Cultivo tecidual – 199)
TE	Transferência de embriões
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TGF-β1	Fator de crescimento transformante beta tipo 1

TGF- β 2	Fator de crescimento transformante beta tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRADD	Domínio de morte associado ao receptor de TNF
TRAF1	Fator 1 associado ao receptor de TNF
TRAF2	Fator 2 associado ao receptor de TNF
TRAF3	Fator 3 associado ao receptor de TNF
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VG	Vesícula germinativa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
G	Gauge
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
$p < 0,05$	Probabilidade de erro menor do que 5%
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. Ovário bovino.....	25
2.2. Foliculogênese e caracterização folicular	26
2.3. Maturação de oócitos bovinos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	29
2.3.1. Transcritos importantes na maturação oocitária	30
2.3.2. Efeito do tamanho folicular e oocitário no processo de maturação	31
2.3.3. Pré-maturação <i>in vitro</i> no cultivo de oócitos	34
2.3.4. Dinâmica e metabolismo mitocondrial	37
2.4. Influência das citocinas na maturação do oócito	41
3. JUSTIFICATIVA	50
4. HIPÓTESE	51
5. OBJETIVOS.....	52
5.1. OBJETIVO GERAL.....	52
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
6. ARTIGO I	53
<i>Influence of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha on the in vitro growth, maturation and mitochondrial distribution of bovine oocytes from small antral follicles</i>	<i>53</i>
7. CONCLUSÕES GERAIS	75
8. PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho bovino de aproximadamente 193,4 milhões de animais, sendo o maior contingente comercial bovino do mundo (ANUALPEC, 2014). Diante deste cenário, o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas, tais como a fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões (TE), têm criado oportunidades extraordinárias para a reprodução animal e proporcionado uma grande potencialização na multiplicação de animais de elevado valor econômico/zootécnico. Na espécie bovina, merece destaque a técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV), associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultra-som (ovum pick up – OPU), a qual tem sido utilizada como instrumento importante para diminuir o intervalo entre gerações e acelerar o melhoramento genético animal (BUENO & BELTRAN, 2008).

Apesar dos importantes avanços alcançados a partir da utilização desta biotécnica, a produção de embriões a partir de fêmeas de alto valor genético pode ser ainda mais eficiente, especialmente quando se considera que, durante a *Ovum pick up* (OPU), uma grande quantidade de oócitos provenientes de folículos ovarianos antrais pequenos (FAPs) são recuperados, mas o processo de maturação *in vitro* (MIV) destes oócitos não ocorre de forma eficiente (LIMA & SANTOS, 2010). Adicionalmente, somente cerca de 30% de embriões são capazes de gerar prenhez após transferência (PONTES *et al.*, 2009). Desta forma, o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que possibilitem o crescimento de oócitos provenientes de FAPs, até estarem aptos à maturação, pode incrementar a PIV de embriões bovinos. Para isso, é necessário o entendimento da fisiologia ovariana, a fim de desenvolver técnicas *in vitro* que possibilitem o máximo aproveitamento das diversas categorias de folículos ovarianos, assim como, substâncias que regulem o processo de maturação oocitária.

Dentre os diversos fatores de crescimento que podem influenciar o desenvolvimento oocitário e folicular, podem-se citar as citocinas, que estão envolvidas nos processos de foliculogênese e da ovulação. Como exemplo de citocinas, destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por desempenhar papel importante na estimulação de oócitos e na regulação do efeito do LH durante a maturação (CRESPO *et al.*, 2012), bem como a interleucina 1 beta (IL-1 β) que pode desempenhar papel intermediário tanto na ovulação como na função folicular (TAKEHARA *et al.*, 1994). Além disso, já se sabe que esses fatores foram identificados

recentemente em folículos pré-antrais e antrais bovinos e que isso sugere uma relação direta com os processos de maturação oocitária e desenvolvimento folicular (SILVA *et al.*, 2017b; PASSOS *et al.*, 2016).

Como pode ser observado, tanto o TNF- α como a IL-1 têm efeitos importantes durante o desenvolvimento folicular. Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir aborda aspectos relacionados ao ovário mamífero, foliculogênese e caracterização celular, maturação de oócitos bovinos *in vivo* e *in vitro*, efeitos do tamanho folicular e oocitário no processo de maturação, pré-maturação *in vitro* no cultivo de oócitos, dinâmica e metabolismo mitocondrial e a influência das citocinas na maturação do oócito, com destaque para a TNF- α e IL-1 β para o processo de maturação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovário bovino

Os ovários bovinos são geralmente ovais, aplanados lateralmente, e medem em média de 3 à 4,5 cm de comprimento (NASCIMENTO *et al.*, 2003). Os ovários contêm milhares de células germinativas que serão utilizadas durante a vida reprodutiva da fêmea, desempenhando como uma de suas principais funções gametogênicas, a liberação de oócitos maduros potencialmente fertilizáveis (McGEE & HSUEH, 2000). Adicionalmente, o ovário produz uma série de substâncias (peptídeos, fatores de crescimento, hormônios, etc) responsáveis pela ciclicidade e manutenção de todo o trato reprodutivo (GUIGON & MAGRE, 2006). Além disso, estudos na espécie bovina tem mostrado variação da morfologia do ovário em função do estágio reprodutivo, ou seja, entre pré-púberes e pós-púberes (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

O ovário dos mamíferos pode ser dividido em região medular e região cortical. A região medular, na maioria das espécies, é a porção interna constituída por tecido conjuntivo, nervos, artérias e veias (SANTOS *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2009). Já o córtex é uma região rica em células conjuntivas e folículos em diferentes categorias (Figura 1) (ALMEIDA *et al.*, 2003). Em cada folículo ovariano está incluso um oócito que também cresce conforme o aumento do diâmetro folicular. O crescimento oocitário em mamíferos é coordenado pela ação de diversas substâncias produzidas por oócitos e células somáticas (células da granulosa, células da teca) e estroma ovariano com função endócrina, parácrina ou autócrina, ou ainda, por meio de comunicações tipo *gap junctions* em ambas as direções, onde um defeito nessas comunicações pode causar infertilidade (KIDDER & VANDERHYDEN, 2010).

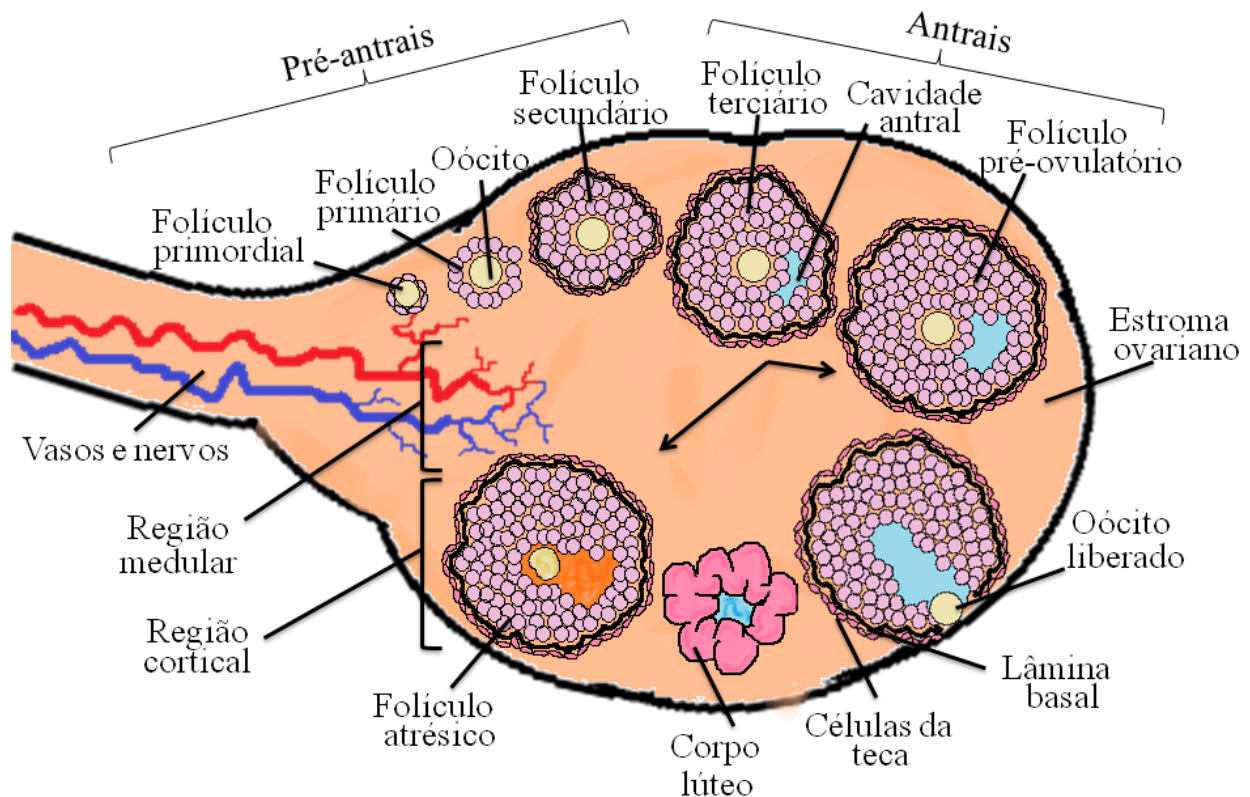


Figura 1. Esquema representativo de um ovário mamífero mostrando a classificação folicular e os possíveis destinos oocitários.

2.2. Foliculogênese e caracterização folicular

Após a colonização dos ovários pelas células germinativas primordiais e posterior diferenciação das oogônias em oócitos, uma camada de células somáticas planas, conhecidas como células da pré-granulosa, circundam os oócitos, formando assim os folículos primordiais (JUENGEL *et al.*, 2002) que, em bovinos, ocorre em torno de 90 dias de gestação (MEYES & SIRARD, 2002). Nesse estágio, os oócitos irão parar em prófase I meiótica, até seu completo desenvolvimento e retomada da meiose.

Os folículos primordiais constituem o *pool* de reserva folicular, compreendendo cerca de 90% de toda população folicular presente nos ovários dos mamíferos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Durante a vida reprodutiva das fêmeas, cada folículo primordial tem três possíveis destinos: (I) manter-se quiescente ou em repouso durante todo o período reprodutivo; (II) ser ativado (sair da quiescência) e fazer parte do pool de folículos em crescimento, podendo sofrer atresia ou ovulação em uma fase posterior do desenvolvimento, ou ainda (III) sair da quiescência

e sofrer atresia diretamente em qualquer fase do desenvolvimento (McGEE & HSUEH, 2000; BROEKMANS *et al.*, 2007).

O processo pelo qual o folículo primordial sai do *pool* de reserva e inicia a fase de crescimento é denominada de ativação folicular, caracterizado por diversas mudanças morfológicas, que incluem o aumento do diâmetro oocitário, a proliferação das células da pré-granulosa, bem como a mudança de formato destas células de pavimentosas para cúbicas (RUSSE, 1983; EDSON *et al.*, 2009). Após passar pelos estádios de folículos primários (camada unilaminar de células cúbicas em torno do oócito) e secundários (duas ou mais camadas de células cúbicas circundando o oócito), observa-se a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, o que caracteriza a formação dos folículos antrais (BRISTOL-GOULD & WOODRUFF, 2006) (Figura 2).

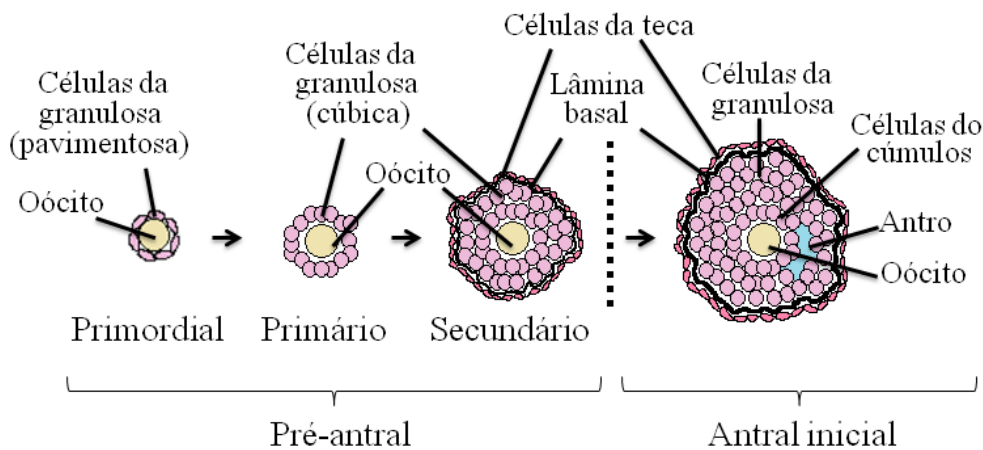


Figura 2. Características morfológicas dos folículos pré-antrais e antrais iniciais.

Dependendo da subespécie bovina, podem acontecer três ou quatro ondas de crescimento dos folículos antrais ao longo do ciclo estral para recrutamento do folículo dominante (FERREIRA *et al.*, 2004). Após um rápido aumento das concentrações do hormônio folículo-estimulante (FSH), os folículos antrais atingem um diâmetro em torno de 2-4 mm, quando são então recrutados para prosseguir o crescimento (HYTTEL *et al.*, 1997; GINTHER *et al.*, 2000). O gene do receptor de FSH está presente no braço curto do cromossomo 2 e são compostos por 10 exons (LATRONICO & SEGALOFF, 1999). O FSH induz o aumento no número de células da granulosa e formação do antro folicular (KOHEK & LATRONICO, 2001). Após o recrutamento, ocorre a fase de seleção e divergência folicular (Figura 3). Nesse momento, um folículo continua a crescer, tornando-se dominante (mais responsivo ao FSH), enquanto os

demais reduzem suas taxas de crescimento, tornando-se subordinados devido ao efeito inibitório do folículo dominante. A divergência folicular é caracterizada por uma diferença na taxa de crescimento entre o futuro folículo dominante e seus subordinados e ocorre concomitante com a diminuição dos níveis plasmáticos de FSH (GINTHER *et al.*, 1996). Esse fenômeno se dá em bovinos quando o maior folículo apresenta em média 8,5 mm (BEG *et al.*, 2002). Após o completo estabelecimento da dominância folicular, os folículos crescem rapidamente e em poucos dias atingem o diâmetro médio de 10-15 mm nas vacas e, em seguida, ocorre à ovulação do complexo *cumulus*-oócito (COC) em resposta ao pico de LH, propiciando a manutenção da fertilidade das fêmeas mamíferas (DRUMMOND, 2006). Além disso, o folículo dominante induz a atresia e bloqueio do recrutamento dos folículos subordinados pela secreção de inibina e estradiol (GINTHER *et al.*, 1996). No folículo pré-ovulatório, na maioria das espécies domésticas, o oócito secundário ovulado aguardará fertilização, retomará a meiose, saindo da fase de prófase I e completando seu desenvolvimento com a produção de um oócito maturo, para completar sua meiose após a fusão com o espermatozóide e expulsão do segundo corpúsculo polar (ARAÚJO *et al.*, 2007).

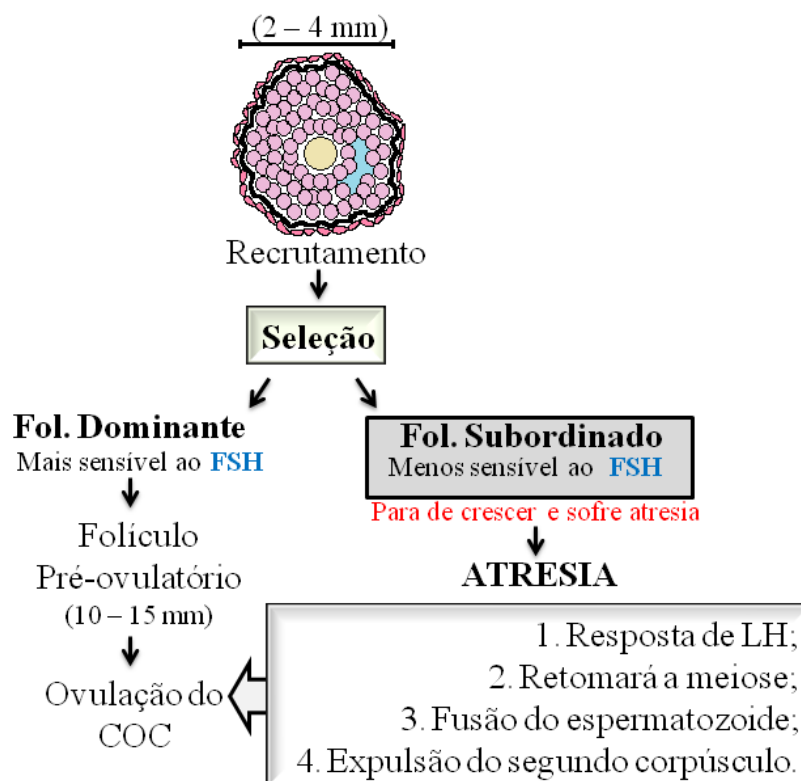


Figura 3. Representação esquemática da fase de seleção folicular.

2.3. Maturação de oócitos bovinos *in vivo* e *in vitro*

A maturação oocitária é uma etapa determinante para o sucesso da técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV), tendo por objetivo obter um oócito apto a ser fecundado, e que tenha capacidade para suportar os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário, até a ativação do seu genoma. Após o início do crescimento, os oócitos armazenam continuamente RNAm, proteínas e substratos metabólicos, passando por um processo de reorganização das organelas citoplasmáticas (BOTIGELLI *et al.*, 2017). A maturação oocitária envolve duas etapas principais: a maturação nuclear, que é marcada pela segregação dos cromossomos e extrusão dos dois corpúsculos polares, e a maturação citoplasmática, a qual envolve modificações citoesqueléticas e moleculares no oócito (TOSTI, 2006).

Durante a maturação, os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GVBD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE *et al.*, 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (SIRARD *et al.*, 1998), modificações moleculares (KUBELKA *et al.*, 2000), redistribuição das organelas intracelulares (GOTTARDI e MINGOTI, 2009) e desenvolvimento dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG *et al.*, 2003). As transformações estruturais são acompanhadas por uma série de atividades bioquímicas estabelecidas por uma complexa cascata de fosforilações e desfosforilações de proteínas envolvidas no reinício e na regulação da meiose (DE SOUSA *et al.*, 2004; DEKEL, 2005; DUMONT *et al.*, 2005).

Durante a maturação citoplasmática ocorrem vários eventos moleculares que incluem um aumento pronunciado na atividade das cinases responsáveis por uma complexa cascata de fosforilação e desfosforilação de proteínas específicas. As cinases dependentes de ciclinas (CDKs) são uma família de serina/treonina cinases envolvidas na regulação do ciclo celular (CDK1, 2, 3, 4, 6 e 7), na transcrição (CDK7, 8 e 9) ou na função neuronal (CDK5) (SCHANG, 2004; MAPELLI *et al.*, 2005). Além dessas, o fator promotor da maturação (MPF), um heterodímero composto de uma subunidade catalítica, p34cdc2 kinase (34KD) e uma subunidade reguladora representada pela ciclina B1 (45KD) (GAUTIER *et al.*, 1990; BILODEAU-GOESEELS, 2012) o qual é responsável pelo início da maturação nuclear do oócito e sua

ativação que precede ou ocorre concomitantemente com o rompimento da vesícula germinativa (WU *et al.*, 1997; LIU & YANG, 1999).

2.3.1. Transcritos importantes na maturação oocitária

Deve-se destacar o papel de outras proteínas durante a maturação gênica oocitária. A histona específica do oócito (H1FOO), também envolvida na condensação da cromatina e transcrição de genes, tem um maior nível de expressão em oócitos no estágio de vesícula germinativa e diminui sua concentração gradualmente no estágio embrionário de oito células (McGRAW *et al.*, 2006). Esse transcrito está presente principalmente no citoplasma dos oócitos (SHENG *et al.*, 2015) e estudos sugerem que ele possui um papel fisiológico importante na compactação do DNA durante a formação da cromatina (XIAO *et al.*, 2012). O c-MOS tem um papel na regulação da montagem do fuso meiótico durante a divisão (ZHAO *et al.*, 1991) e desencadeia a cascata da MAPK e a ativação do MPF durante a maturação de oócitos (CASTRO *et al.*, 2001). Já o aumento da expressão do fator de crescimento e diferenciação – 9 (GDF-9) no oócito durante o crescimento folicular até antes da maturação é importante para o desenvolvimento folicular, sendo necessário para expansão das células do cumulus (KONA *et al.*, 2016), ou seja, são secretados pelo oócito com papel importante na modulação das células circunvizinhas e competência do oócito (BELLI & SHIMASAKI, 2018). Além disso, O GDF-9 tem papel na manutenção da viabilidade folicular e proliferação das células da granulosa na espécie humana (HREINSSON *et al.*, 2002). Desta forma, muitos transcritos de RNA precisam ser produzidos e estocados, para que tanto a maturação nuclear quanto a citoplasmática ocorram com sucesso.

A maturação do oócito envolve muitos mecanismos complexos, muitos dos quais não estão totalmente compreendidos. Devido a esse fato, a maturação *in vitro* ainda não é totalmente eficiente a ponto de proporcionar um grande número de oócitos competentes que suportem o desenvolvimento embrionário completo. Assim, torna-se necessário focar a atenção nos diversos fatores de crescimento que são secretados pelo oócito, cujas funções são de controlar aspectos fundamentais das atividades das células do cumulus, como também, fatores secretados pelas células do cumulus que controlam aspectos fundamentais no oócito (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Além disso, estudos mostram que as citocinas (IL- β e TNF- α) estão também envolvidas

tanto como fatores exógenos como endógenos no desenvolvimento folicular, atresia e maturação em mamíferos (SATO, 2015).

2.3.2. Efeito do tamanho folicular e oocitário no processo de maturação

Em bovinos, a relação entre o tamanho do folículo e a qualidade do oócito foi claramente demonstrada recentemente. Labrecque *et al.* (2016) estudaram a quantidade e tipos de proteínas em folículos de diversos tamanhos e verificaram poucas diferenças entre o transcriptoma de folículos menores 3 mm e de folículos de 3 a 5 mm. No entanto, folículos maiores que 8 mm possuem uma diferença abrupta em comparação aos folículos menores que 5 mm na espécie bovina. Adicionalmente, outros estudos em bovinos avaliaram folículos de 3 a 8 mm, tendo sido relatado que os níveis de transcritos para os genes MATER e OCT-4 em oócitos em conjunto com a concentração de progesterona folicular, podem ser bons indicadores para a competência oocitária (URREGO *et al.*, 2015). Nessa espécie, a competência oocitária é adquirida durante o crescimento folicular e está diretamente relacionada ao tamanho do oócito e do diâmetro folicular. Assim, há forte correlação entre oócitos que possuem em torno de 110-120 μm , inclusos em folículos a partir de 2-3 mm de diâmetro, os quais são considerados competentes para retomada da meiose (FAIR *et al.*, 1995). É importante ressaltar que os folículos antrais pequenos são recrutados e iniciam o crescimento em direção a ovulação após alcançarem um diâmetro médio de 4 mm (GINTHER, *et al.*, 2000). Após esse estágio, o hormônio folículo estimulante (FSH) e diversos fatores de crescimento produzidos localmente no ovário são responsáveis pelo crescimento folicular (MARTINS *et al.*, 2008). À medida que os oócitos crescem, os níveis de metilação em regiões diferencialmente metiladas (DMR) aumenta, demonstrando que a metilação é adquirida de acordo com o tamanho dos oócitos em bovinos (O'DOHERTY *et al.*, 2012). Porém, há relatos que alelos metilados aberrantemente nos oócitos de folículos pequenos (≤ 2 mm) isolados aumentaram em comparação com a categoria de folículos médios (3-5 mm) e grandes (≥ 6 mm) quando cultivados *in vitro* (MATTERN *et al.*, 2017). Além disso, Luciano *et al.* (2011) mencionaram que os processos da diferenciação da estrutura e função da cromatina no oócito em vesícula germinativa (VG) é controlado pela cooperação das células somáticas na manutenção de AMPc apropriado no interior do oócito.

As células do cumulus (CCs) tem grande relevância na manutenção da competência oocitária através das junções *gaps*. Em suínos, Bagg *et al.* (2009) relataram que COCs de folículos de 3 mm mantem comunicação por meio de junções *gap* por mais tempo que COCs de folículos de 5 à 8 mm durante a maturação *in vitro* (MIV). Porém, a expansão das células do cumulus e o acúmulo de AMPc (dentro e fora do oócito) é inferior em folículos de 3 mm quando comparados com folículos de 5 à 8 mm. Além disso, outros estudos demonstraram que tanto os níveis de AMPc como GMPc, mudam nas primeiras 20 horas de MIV e esses níveis são diferentes entre COCs de folículos pequenos (1-3 mm) e médios (3-6 mm) (OKUDAIRA, 2017). Um estudo sobre o efeito do desnudamento de oócitos suínos na maturação relata que, independentemente do tamanho do folículo, a desnudação de oócitos após 20 horas de MIV promove a progressão meiótica em metafase (MII), embora a morfologia normal dos oócitos maturados possa ser em decorrência da comunicação das CCs durante as 44 horas de MIV (FERRÉ *et al.*, 2016). Durante o cultivo *in vitro* de oócitos, de pequenos folículos antrais suínos (1,2-1,5 mm), em meio suplementado com dibutilil adenosina monofosfato cíclico (dbcAMP) e FSH durante cinco dias, a interrupção da meiose foi devido a presecção de junções comunicantes entre as CCs e os oócitos (CAYO-COLCA *et al.*, 2011). Porém, Topfer *et al.* (2016) comprovaram que, por mais que os oócitos suínos de folículos grandes (> 4 mm) apresentassem maior capacidade de maturação nuclear e citoplasmática, as diferenças não parecem ser mediadas pelo AMPc.

Alguns fatores de crescimento têm sido amplamente estudados nas diversas categorias foliculares. De acordo com Oberlender *et al.* (2013), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) favorece a maturação de folículos de suínos entre 2-5 mm de diâmetro em comparação aos folículos de 6-10 mm de diâmetro, o que tem impactos na melhoria dos resultados da eficiência da FIV. No entanto, o IGF-I não apresenta efeito sobre a MIV ou FIV de oócitos oriundos de folículos de 6-10 mm. Já a inibina β (INH β) pertencente à superfamília do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) pode ser considerada um marcador de maturação de folículos e oócitos suínos. Estudos demonstram que a expressão da inibina β A é maior em oócitos de folículos grandes (> 5 mm) e médios (3-5 mm) quando comparados com oócitos de folículos pequenos (< 3 mm), enquanto que a expressão da inibina β B é maior em oócitos de folículos grandes do que em oócitos de folículos pequenos, de modo que sua expressão está associada ao crescimento e o desenvolvimento folicular (KEMPISTY *et al.*, 2015). Em

suínos, foi reportado que os fatores de crescimento transformante beta 1 (TGF β 1) e beta 2 (TGF β 2) apresentaram aumentos em folículos maiores que 5 mm quando comparados com folículos médios (3-5 mm) e pequenos (< 3 mm), levando assim a supor que a expressão dos genes TGF β 1 e TGF β 2 está associada ao estágio de maturação de oócitos e ao tamanho folicular (JACKOWSKA *et al.*, 2013). Desta forma, folículos menores possuem limitações no desenvolvimento durante a MIV pela quantidade insuficiente de transcritos. Bui *et al.* (2016) relataram em suínos que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) melhora a habilidade meiótica *in vitro* de oócitos oriundos de folículos com diâmetro entre 0,5-3 mm durante as primeiras 20 h da MIV. Além disso, estudos em suínos mostraram maior síntese de estradiol (E2) e menor síntese de progesterona (P4) em oócitos de folículos grandes (> 4,0 mm) nas primeiras 28 h de MIV. Neste estudo, observou-se que ocorreu uma maior taxa de maturação nuclear e citoplasmática em decorrência da capacidade desses folículos (> 4,0 mm) em sintetizar E2 e suprimir os níveis de P4 em comparação com os folículos de 2,5-4,0 mm de diâmetro (TOPFER *et al.*, 2016). No entanto, em primatas, mesmo com baixo nível de transcritos intracelulares, verifica-se que os oócitos de folículos pequenos (\geq 0,5 mm) podem retomar a meiose na ausência de gonadotropina coriônica humana (hCG) associando-se a redução dos níveis de E2, P4 e hormônio antimulleriano (AMH). No entanto, a taxa de maturação nuclear aumenta na presença do hCG, que eleva os níveis de P4 (PELUFFO *et al.*, 2013).

Em humanos, a expressão gênica nas CCs de folículos < 6 mm capazes de atingir MII após a MIV é semelhante a observada após a maturação *in vivo*. A expressão de genes que codificam receptores envolvidos na retomada da meiose são expressos em folículos antrais pequenos humanos, mas outros genes (*ADAMTS1*, *AREG*, *PTGS2* e *HAS2*) envolvidos na competência do oócito, foram significamente alterados em comparação com os genes expressos durante a maturação *in vivo* (GUZMAN *et al.*, 2013). Em caprinos, a expressão dos genes associados ao desenvolvimento embrionário e fetal (*MATER*, *IGF2R* e *GRB10*) apresentou maiores níveis em oócitos em metafase II de folículos \geq 3 mm quando comparados com os folículos menores que 3 mm de diâmetro (YANG *et al.*, 2016). Em caprinos pré-puberes, COCs provindos de pequenos folículos (<3 mm) em co-cultivo com oócitos desnudos (DOs) de folículos pequenos e grandes apresentaram melhor capacidade de desenvolvimento embrionário (ROMAGUERA *et al.*, 2010). Isso mostra que além da comunicação entre as células do cumulus e o oócito, existem metabólitos secretados pelo oócito que favorecem o desenvolvimento

embrionário de folículos pequenos. Além disso, já foi reportado que a suplementação de meio de cultivo de folículos pequenos (0,5-2 mm) com 10 ng/ml de anfiregulina (AREG) aumenta as taxas de maturação nuclear de oócitos recrutados de macacos *rhesus* (PELUFFO *et al.*, 2012). Em conjunto, estes resultados podem ser observados na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação de níveis de RNAm e/ou efeitos de substâncias em oócitos de folículos de tamanhos diferentes em várias espécies.

Espécie	Tamanho folicular	Efeitos nos oócitos
Caprina (oócito em MII)	≥ 3 mm	Apresentou maior nível de expressão MATER, IGF2R e GRB10
	< 3 mm	Menor nível de expressão de MATER, IGF2R e GRB10.
Suína	2 – 5 mm	Adição de IGF-I na MIV favoreceu a maturação.
	6 – 10 mm	Adição na MIV não influenciou a maturação.
Suína	3 – 5 mm e > 5 mm	Maior nível de expressão de Inibina β (INH β), assim, pode ser considerado um marcador de maturação.
	< 3 mm	Menor nível de expressão de INH β .
Suína	> 5 mm	Apresenta aumento de TGF $\beta 1$ e $\beta 2$ (Esta associado ao estágio de maturação oocitaria e ao tamanho folicular).
	3 – 5 mm e > 3 mm	Não aumentou.
Suína	0,5 – 3 mm	O VEGF melhora a habilidade meiótica <i>in vitro</i> .
Suína	1,2 – 1,5 mm	O dibutilil AMPc e FSH mantem a parada meiótica e projeções transzonais de CCs para o oócito, respectivamente.
Macaco <i>rhesus</i>	0,5 – 2 mm	Anfiregulina (AREG) aumenta as taxas de maturação nuclear.

2.3.3. Pré-maturação *in vitro* no cultivo de oócitos

A pré-maturação de oócitos, que basicamente consiste na inibição da retomada da meiose, tem sido sugerida como uma estratégia para que os oócitos adquiram um tempo adicional para acúmulo de moléculas, necessárias para aquisição de competência para fertilização e para assegurar o desenvolvimento embrionário inicial (LONERGAN *et al.*, 2000; BILODEAU-GOESSELS, 2012). Dentre os benefícios da pré-maturação, podemos citar a possibilidade de utilização de oócitos bovinos de pequenos folículos antrais que seriam descartados (De BEM *et*

al., 2011). Durante a pré-maturação, vários protocolos utilizam moléculas como o peptídeo natriurético C ou fármacos, para bloqueio da meiose durante o período do cultivo *in vitro* (FARGHALY *et al.*, 2015; GUEMRA *et al.*, 2014; ROMERO *et al.*, 2016). Entre os diversos fármacos, podemos destacar a cilostamida e a isobutil-metilxantina (inibidoras da fosfodiesterase-3A), a forskolina (ativadora da adenilato ciclase), a roscovitina (inibidora do fator promotor da maturação – MPF) e a butirolactone I (um inibidor seletivo de cinases dependentes de ciclina – cdk2 e cdc2), já explicado anteriormente (FARGHALY *et al.*, 2015; GUEMRA *et al.*, 2014).

Vários fatores são responsáveis pelo bloqueio da meiose no oócito (Figura 4). Estudos mostram que a manutenção da concentração do AMPc mantém o oócito em vesícula germinativa (LI *et al.*, 2016), estimulando a atividade inibitória do PKA que mantém fosforilado os resíduos de tirosina 14 e treonina 15 da subunidade Cdk1 do MPF (TRIPHATI, KUMAR & CHAUBE, 2010). Para isso, existem várias vias de sinalização parácrinas e autócrinas que mantêm a concentração adequada de AMPc intraoocitário. As células da granulosa produzem moléculas de AMPc que são transportados para dentro do oócito através das junções *gap* (CHAUBE, 2002). A adenil ciclase (AC) está envolvida na síntese de AMPc no oócito (CONTI *et al.*, 2002) e assim, ajuda a manter as concentrações de AMPc pela ativação dos receptores de proteína G estimulatória (GPCRs) na membrana e transformando ATP em AMPc (TRIPATHI, KUMAR & CHAUBE, 2010). No entanto, existem moléculas como a fosfodiesterase 3 (PDE3), que estão envolvidas na hidrólise desses AMPc intraoocitário (CONTI *et al.*, 2002). Vale ressaltar que a guanosina monofosfato cíclica (GMPc), transportada das células da granulosa e da teca para o oócito, inibe a PDE 3 (BILODEAU-GOESEELS, 2011).

Na espécie bovina, a pré-maturação na presença de cilostamida (10 μ M) por 72 h foi suficiente para melhoria da competência de oócitos bovinos de folículos antrais de 2 – 6 mm de diâmetro (FARGHALY *et al.*, 2015), bem como, contribuiu para melhoria da qualidade de embriões de oócitos bovinos de folículos de 3 – 8 mm pré-maturados nessa mesma condição (DIÓGENES *et al.*, 2017). Além da cilostamida, estudos mostraram que a pré-maturação de COCs bovinos de folículos de 2 a 8 mm com 100 μ M de butirolactona I (BLI) bloqueia reversivelmente a meiose, sem danificar o fuso meiótico ou a distribuição cromossômica do oócito (FERREIRA *et al.*, 2009). Dessa forma, o bloqueio da meiose durante a pré-maturação utilizando a BLI é uma estratégia para o transporte de oócitos destinados a PIV de embriões

(GUEMRA *et al.*, 2014). Nessa mesma espécie, utilizando oócitos de folículos pequenos, estudos têm demonstrado que o crescimento *in vitro* por 12 dias seguidos de pré-maturação foi considerado um sistema ótimo de processamento de oócitos bovinos derivados de folículos antrais com 0,5 a 1 mm de diâmetro, considerando a viabilidade, o diâmetro, a maturação e o desenvolvimento do oócito (HUANG *et al.*, 2013).

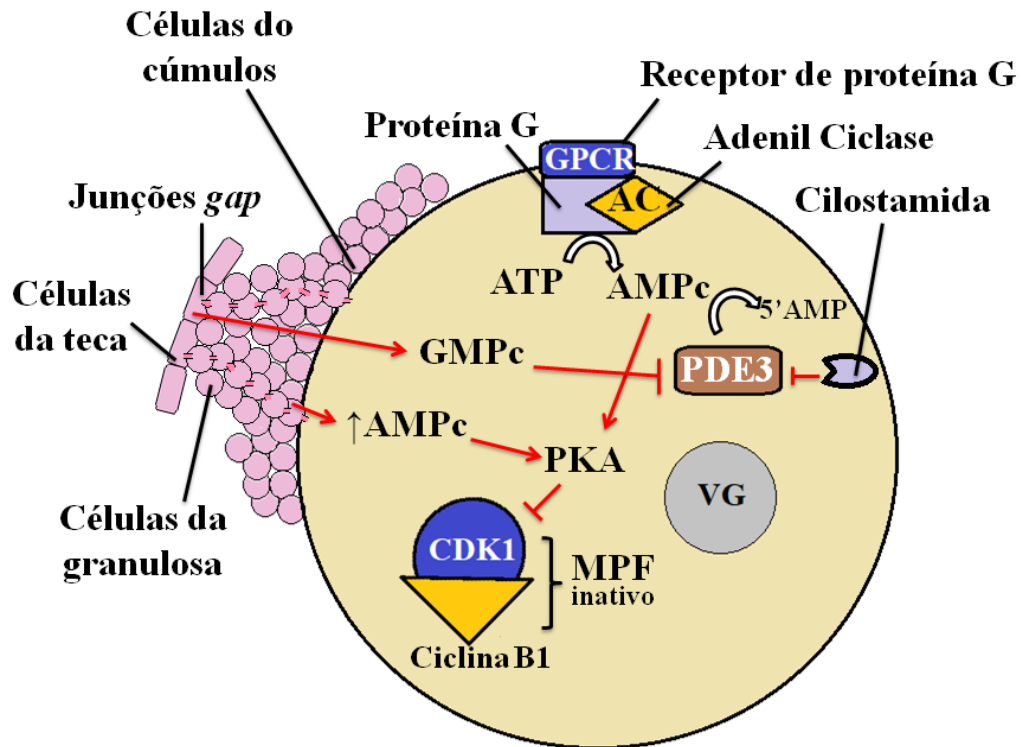


Figura 4. Esquema representativo do mecanismo de retenção da meiose em oócitos. O AMPc é responsável pela ativação do PKA que, por sua vez, fosforila resíduos de serina 14 e treonina 15 da subunidade CDK1 do MPF mantendo-o inativo. O AMPc tanto é produzido no oócito, pela atividade da adenil ciclase, como é produzido nas células do cumulus e da granulosa e são transferidos para o oócito via junções *gap*. O GMPc contribui para a retenção da meiose pois inibe enzimas que hidrolizam o AMPc (fosfodiesterase 3). Essas vias de sinalizações contribuem para manter o oócito em VG (Adaptado de TRIPATHI, KUMAR & CHAUBE, 2010).

Em outras espécies, a pré-maturação tem apresentado excelentes resultados. Estudos realizados com camundongos mostraram que a pré-maturação de oócitos na presença de forskolina e FSH influencia positivamente a competência do oócito, sugerindo um efeito na produção de AMPc (ZENG *et al.*, 2014). Na espécie ovina, 1 μ M de cilostamida e / ou 50 μ M de forskolina manteve a parada meiótica em oócitos de folículos antrais (2 – 6 mm) (AZARI-

DOLATABAD *et al.*, 2016). Em outro estudo com oócitos ovinos de folículos antrais de 2 a 6 mm, a cilostamida foi eficiente para realizar bloqueio da meiose na pré-maturação, sendo os seus efeitos reversíveis (GHARIBI *et al.*, 2013). Em suínos, a utilização de cilostamida a 1 μ M em COCs de folículos de 3 – 6 mm de diâmetro retardou a meiose durante a pré-maturação e manteve as junções *gap* durante o período de maturação por 24 h (DIECI *et al.* 2013). Na espécie humana, estudos sugerem que o peptídeo natriurético C (NPC) e a anfirregulina (AREG) durante a pré-maturação podem melhorar o caminho eficientemente entre MIV e FIV de oócitos humanos de folículos (2-8 mm) de ovário policísticos (SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

2.3.4. Dinâmica e metabolismo mitocondrial

A mitocôndria é a organela mais importante para determinar a sobrevivência e morte celular (CAMARA, LESNEFSKY & STOWE, 2010). No folículo, existe um aumento gradual de cópias de mtDNA ao longo da oogênese, desde folículo primordial até folículo de *Graaf*, sendo essencial para produzir ATP suficiente para a reorganização citoesquelética e desenvolvimento citoplasmático de oócitos em preparação para competência e retomada da meiose (COTTERILL *et al.*, 2013). Além disso, o volume citoplasmático e a quantidade de mitocôndrias são maiores em oócitos de mamíferos quando comparados às células somáticas (COTTERILL *et al.*, 2013). No entanto, estudos mostram que cópias de mtDNA, taxas de fertilização e quantidade de ATP entre vacas jovens (21-89 meses) e velhas (mais de 89 meses) são afetadas com a idade do animal (IWATA *et al.*, 2011). Em vacas com mais de 180 meses de idade, há consequências negativas na capacidade de clivagem dos oócitos e o número de cópias de mtDNA nos oócitos tende a diminuir (TAKEO *et al.*, 2013). A disfunção das mitocôndrias e do sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) aumentam com a idade e correlacionam-se com muitas doenças relacionadas com a idade, como câncer e neurodegeneração (GUMENI & TROUGAKOS, 2016).

No processo de maturação citoplasmática do oócito, ocorre a redistribuição das organelas celulares, com migração das mitocôndrias para a região perinuclear, pois segundo Picton, Briggs & Gosden (1998), as mitocôndrias estão localizadas periféricamente em oócitos imaturos e mais centrais em oócitos maduros, e a agregação de grânulos na extensão do oolema. Estudos têm mostrado que existe formação de redes mitocondriais ligadas entre si por túbulos

mediados pela cinesina-1 (KIF5B) na região periférica, que é importante para a integridade do DNA mitocondrial e o intercâmbio de material mitocondrial (WANG *et al.*, 2015). Além disso, estudos mostram a necessidade da dineína para o movimento interno dos centros organizadores de microtúbulos (MTOC) (COURTOIS *et al.*, 2012). Yamochi *et al.* (2015) sugere que o citoesqueleto e as proteínas motoras possuem papel importante na localização das mitocôndrias em locais que necessitem de energia. Dalton e Carroll (2013) sugerem que o balanço entre as atividades das proteínas motoras dineína e cinesina-1 garantem o máximo da herança mitocondrial ao oócito após a divisão meiótica assimétrica, onde a proteína motora dineína está envolvida na distribuição mitocondrial em direção ao fuso meiótico e a cinesina-1 envolvida na distribuição em sentido oposto ao fuso meiótico (Figura 5).

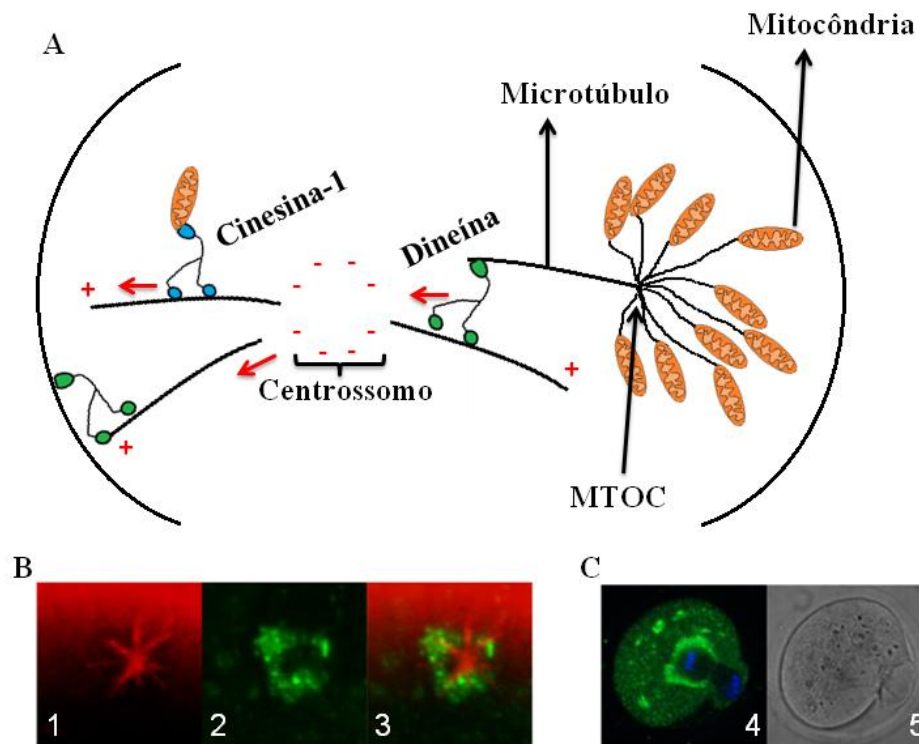


Figura 5. Movimento mitocondrial. a) Esquema representativo da movimentação mitocondrial em oócitos de camundongos orquestrada pelas proteínas motoras dineína e cinesina-1. b) 1 – Tubulinas formando os centros organizadores de microtúbulos (MTOC) (vermelho); 2 - mitocôndrias (verde); e 3 – sobreposição de 1 e 2. c) Oócito fixado no momento da primeira extrusão do corpúsculo polar; 4 – Mitocôndrias coradas de verde e DNA de azul e 5 – oócito sem coloração (Adaptado de Dalton & Carroll 2013).

A mitocôndria é fundamental tanto para o metabolismo energético como para a homeostase de cálcio e apoptose no oócito (SUGIYAMA *et al.*, 2015). No interior da mitocôndria, o ATP é obtido em uma reação com a redução de O₂ para formar H₂O mediado pela cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna, que transfere os elétrons dos cofatores reduzidos (NADH e FADH₂) para o receptor de O₂ (APOSTOLOVA & VICTOR, 2015). Estudos têm mostrado que o pico de atividade mitocondrial chegou a seu ápice em 10h durante pré-maturação de 20h e está envolvida na maturação nuclear e na competência do desenvolvimento do oócito, durante o crescimento *in vitro* de oócitos bovinos de folículos de 2 – 8 mm (HUANG *et al.*, 2014). Em outro estudo, durante a progressão da meiose em camundongos, tem-se observado a ação da ELMOD2, que é uma proteína ativadora de GTPase (GAP) essencial na interação com a ARL2, uma GTPase envolvida na manutenção da dinâmica mitocondrial e níveis de ATP no oócito (ZHOU *et al.*, 2017). O ARL2 também está envolvida na morfologia e motilidade mitocondrial (NEWMAN *et al.*, 2014). Além disso, evidências sugerem que aberturas de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) desempenham um importante papel fisiológico na regulação do Ca²⁺ intramitocondrial mantendo a homeostase saudável das mitocôndrias (ZOROV, JUHASZOVA & SOLLOTT, 2014). Parece que as ROS e o aumento de cálcio intracelular participam da ativação do NF-κβ (GLEZER *et al.*, 2000). Assim, estudos sugerem que existe um relacionamento bidirecional que liga a morfologia, a sensibilidade ao mPTP, a respiração e a produção de ROS onde esses aspectos regulam a sinalização intracelular (PICARD *et al.*, 2013). Como exemplo, a melatonina produzida pela mitocôndria melhora a homeostase das mitocôndrias pela eliminação de ROS inibindo o mPTP e ativando proteínas de desacoplamento (UCPs) (TAN *et al.*, 2016). A fissão e a fusão mitocondrial estão envolvidas na morfologia mitocondrial e podem ser influenciadas por propriedades das membranas mitocondriais (WESTRATE *et al.*, 2014). As ROS produzidas pelas mitocôndrias melhora a expressão de p38 MAPK e JNK, bem como a sua fosforilação, após a translocação nuclear NF-κβ ativada em macrófagos que é inibida por inibidores ROS dependente de mitocôndria (GAN *et al.*, 2016).

Os membros da família MAPK são subdivididos nas subfamílias p38, JNK (*c-Jun amino-terminal kinase*) e ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) (HANKS & HUNTER, 1995). Estudos mostram que as p38 MAPK pode ser fosforilada induzindo cascatas de moléculas efetoras e/ou ativadoras através de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias (IL-1 e TNF-α)

e ROS onde a translocação de p38 para núcleo controla a expressão de enzimas envolvidas em rotas antioxidantes na proliferação, diferenciação, inflamação e apoptose (NEGREDA & PORRAS, 2000). Além disso, a transdução de sinal através da JNK induz mecanismos de defesa contra estresses oxidativos e xenobióticos agudos, como também em eventos moleculares envolvidos na regulação da autofagia (ZHOU *et al.*, 2015; SUI *et al.*, 2014).

Técnicas como a vitrificação são utilizadas para prolongar a vida útil de oócitos. Estudos mostram que no processo de vitrificação a competência de desenvolvimento e o conteúdo de ATP em oócitos de camundongos não são afetados, mas ocorrem algumas alterações na distribuição mitocondrial nos oócitos maturados em comparação aos grupos não vitrificados (NAZMARA, SALEHNIA & HOSSEIN-KHANI, 2014). No entanto, a MIV pode causar efeitos negativos nas taxas de desenvolvimento de oócitos, pela alteração da dinâmica mitocondrial e o aumento de gotas lipídicas (COLLADO *et al.*, 2016). Em camundongos, onde COCs foram tratados com AMPc durante a pré-maturação e FSH durante a maturação, houve influência positiva na competência do oócito, na estabilidade meiótica, no aumento do metabolismo oxidativo e na produção de ATP. No entanto, o FSH aumentou a produção de ROS em comparação com a maturação *in vivo* (ZENG *et al.*, 2014). Estudos mostram que existem mudanças óbvias na distribuição mitocondrial (de periférica para homogênea) em oócitos humanos, antes e depois da maturação *in vitro* respectivamente (LIU *et al.*, 2010). Em oócitos humanos, a distribuição mitocondrial durante o estágio de vesícula germinativa é agregado na região pericortical e após a quebra da vesícula germinativa, as mitocôndrias passam rapidamente para toda a parte do oócito, demonstrando uma distribuição homogênea (TAKAHASHI *et al.*, 2017). No entanto, o cultivo de oócitos bovinos de folículos antrais pequenos (0,4 a 0,8 mm) mostraram uma mudança em sua distribuição mitocondrial predominante homogênea no início do cultivo em VG, para uma distribuição heterogênea, mas sem nenhum oócito maturado após 14 dias de CIV (KATSKA-KSIAZKIEWICZ *et al.*, 2011). É possível prolongar o tempo de cultivo de complexos *cumulus* oócitos a um período superior a sete dias, mas é necessário diminuir o metabolismo energético, pois estudos mostram que o cultivo acima de sete dias (até 14 dias) proporciona degeneração de oócitos bovinos de folículos antrais pequenos (KATSKA-KSIAZKIEWICZ *et al.*, 2011).

2.4. Influência das citocinas na maturação do oócito

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, extremamente potentes, que irão se ligar em seus receptores específicos, provocando alteração de síntese do RNA e de proteínas de diferentes tipos de células do organismo (KRAYCHETE, CALASANS e VALENTE, 2006). As citocinas pro-inflamatórias são produzidas por macrófagos ativados e estão envolvidas na regulação de reações inflamatórias (ZHANG, 2007). Elas estão correlacionadas com a estimulação ou inibição do crescimento, diferenciação, quimiotaxia e modulação da expressão gênica nas células, e podem ser sintetizadas por vários tipos celulares como macrófagos, monócitos, células endoteliais, linfócitos entre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2011; GARCIA, ISSY e SAKATA, 2002). As citocinas e as células que fazem parte do sistema imunológico têm uma relação bem íntima com os processos da produção de gametas femininos e masculinos e com o crescimento embrionário (INGMAN & JONES, 2008). Além disso, as citocinas interagem de forma sistêmica e complexa, influenciando o desenvolvimento, a função e a produção de hormônios nos ovários (BORNSTEIN, RUTKOWSKI e VREZAS, 2004).

Em bovinos, o TNF- α é sintetizado pelo oócito e pelas células da granulosa de folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento (Silva *et al.*, 2017b), e já foi identificado que esta proteína, com uma massa de 17,3 kDa, está presente nos ovários de vários animais, incluindo coelhas (BAGAVANDOSS *et al.*, 1990), vacas (ROBY *et al.*, 1989) e seres humanos (ROBY *et al.*, 1990b), inclusive nas células da teca, granulosa, oócitos e no corpo lúteo (SOUZA & VELÁSQUEZ, 2008). Além disso, o sistema TNF- α está presente nos folículos pré-antrais e antrais (SILVA *et al.*, 2017a) e atua na indução da proliferação celular de folículos suínos (PRANGE-KIEL *et al.*, 2001) e folículos secundários de bovinos (PAULINO *et al.*, 2017). O TNF- α age ligando-se a um de seus dois receptores subtipo distintos: receptor do tipo I (TNFR1), que é de aproximadamente 60 kDa e o receptor do tipo II (TNFR2). Os receptores são proteínas transmembranares com porções citoplasmáticas que iniciam a transdução de sinal a partir da ligação ao TNF- α (Figura 6). Relatos prévios confirmam que o TNFR1 é expresso no ovário, pelos efeitos do TNF sobre o desenvolvimento e diferenciação celular, bem como indução da morte celular programada durante a formação do corpo lúteo, afetando principalmente as células endoteliais (FRIEDMAN *et al.*, 2000; SAKUMOTO & OKUDA, 2004; SOUZA & VELÁSQUEZ, 2008). Além disso, estudos mostram que o TNFR1 pode promover tanto apoptose

quanto a sobrevivência celular e o TNFR2, além de promover a sobrevivência, pode induzir tanto apoptose quanto a proliferação celular (FAUSTMAN & DAVIS, 2013).

Após ativação do TNFR1, a sinalização inicia com o recrutamento de várias proteínas adaptadoras para formar o complexo I, (complexo I – TNF-R associado ao domínio de morte (TRADD), fator 2 associado ao TNF (TRAF2) e a RIP1 – proteína que interage o receptor), que é liberado do TNFR1 para formar o complexo II (complexo II – complexo 1 mais o domínio de morte associado a Fas (FADD) e a pró-caspase 8/10) responsável pela apoptose (MICHEAU & TSCHOPP, 2003; WULLAERT et al., 2007). No entanto, a proteína TRADD, de 34 kDa que interage com o domínio intracelular de TNFR1 pode ser suprimida pelo gene *crmA* (HSU, XIONG & GOEDDEL, 1995). Além disso, o receptor TNFR1 também pode ativar o fator de transcrição NF- κ B e promover a sobrevivência pela permanência do inibidor da caspase-8 (FLIP) (MICHEAU & TSCHOPP, 2003). Os membros p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 e p52/p100 da família NF- κ B aparecem nas células como homo ou heterodímeros ligados a proteínas I κ B (HAYDEN & GHOSH, 2004). O fator NF- κ B, quando não estimulado, encontra-se ligado ao I κ B (uma das proteínas inibitória do NF- κ B) onde a fosforilação e a degradação do I κ B é necessária para que ocorra a translocação do NF- κ B (p65 e p50) para o núcleo (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996). A estimulação do IKK [composto pelo complexo NEMO (subunidade IKK γ), IKK α e IKK β] promove a via clássica da translocação do NF- κ B para o núcleo (RAUERT *et al.*, 2010). A via clássica pode ser ativada tanto pelo TNFR1 quanto TNFR2. O modificador essencial de NF- κ B (NEMO) sinaliza ativação da subunidade beta do complexo I κ B quinase (IKK β) que depois, fosforila a proteína I κ B em dois resíduos de serina no N-terminal que torna reconhecido pela ubiquitina-ligase, levando à sua poliubiquitinação e posterior degradação pelo proteossoma (Figura 6) (HAYDEN & GHOSH, 2004).

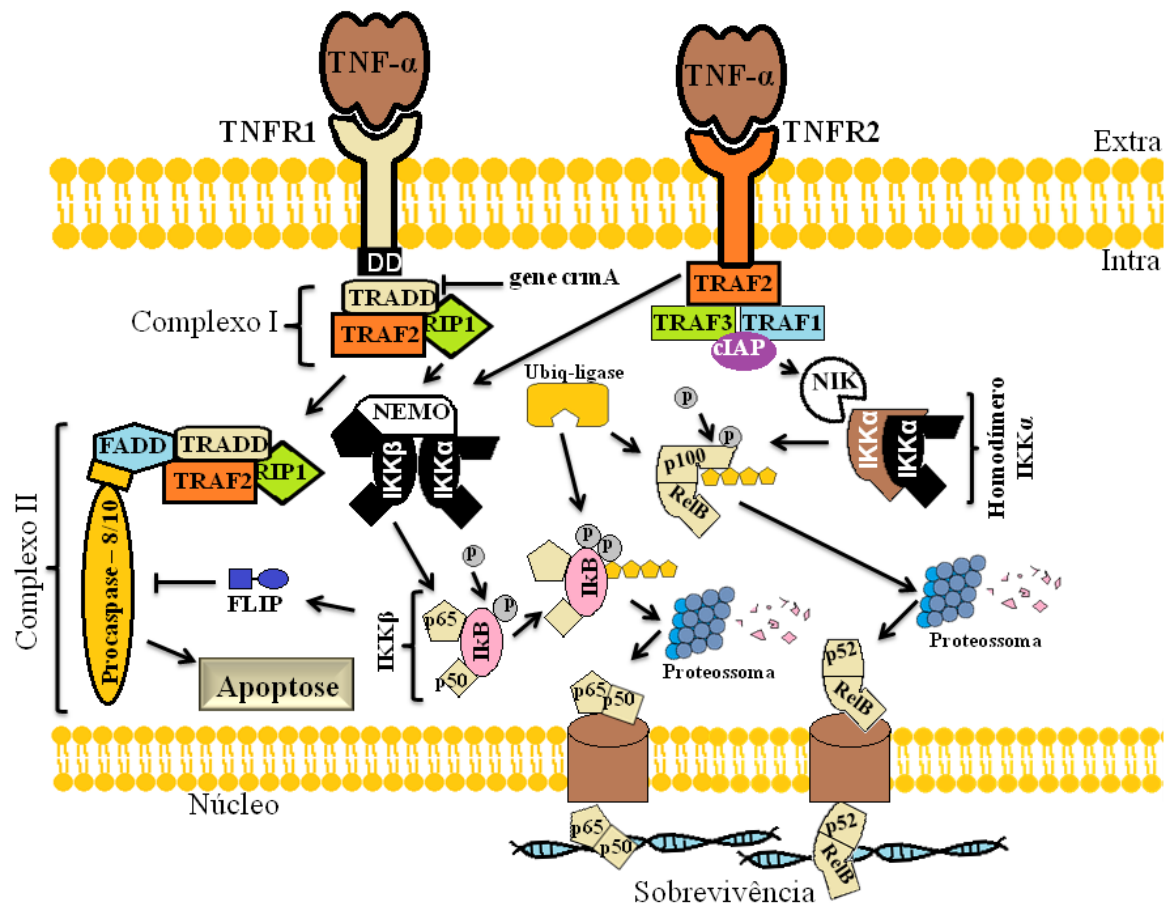


Figura 6. Mostra a via apoptótica, clássica e alternativa do sistema TNF- α com seus receptores (TNFR1 ou TNFR2) capazes de promover transdução de sinal. A via clássica acontece através da ativação do NEMO e a via alternativa através da ativação da NIK. O TNFR1 pode desencadear apoptose pela da formação do complexo II, com a ligação do FADD e procaspase – 8/10, e sobrevivência celular através da via clássica com a ativação da FLIP (inibidor da pro-caspase – 8/10). Contudo, o TNFR2 pode desencadear sobrevivência pela via clássica e alternativa (HAYDEN & GHOSH, 2004; RAUERT *et al.*, 2010; BAEUERLE & BALTIMORE, 1996; MICHEAU & TSCHOPP, 2003; WULLAERT *et al.*, 2007).

No entanto, a via alternativa do NF- κ B através da fosforilação do complexo IKK α (composto por p100 e RelB) é independente da estimulação do NEMO (SUN & LEY, 2008). Primeiramente, o TNFR2 sinaliza o TRAF2 que se liga ao fator 1 associado ao TNF (TRAF1), fator 3 associado ao TNF (TRAF3) e proteína inibidora de apoptose (cIAP) (ROTHER *et al.*, 1995). Esse complexo ativa a quinase indutora NF- κ B (NIK), responsável pela fosforilação e ativação do homodímero IKK α (XIÃO *et al.*, 2001; SENFTLEBEN *et al.*, 2001). Essa

sinalização desencadeia o processamento da p100 (RAUERT *et al.*, 2010) onde será fosforilado dois C-terminais do IKK α para degradação proteossomica, gerando p52 que é translocado para o núcleo (Figura 6) (RAUERT *et al.*, 2010). Estudos sugerem que a via clássica e alternativa do NF-k β possuem funções regulatórias distintas (BONIZZI & KARIN, 2004).

Os oócitos e as células do cumulus de humanos expressam tanto o RNAm quanto a proteína para TNF- α e seu TNFRII (NAZ *et al.*, 1997). O TNFRII pode induzir a transcrição de genes para sobrevivência, crescimento e diferenciação celular (SAKUMOTO & OKUDA, 2004). A expressão de receptores para TNF- α também foi determinada nas células da granulosa em bovinos (SPICER *et al.*, 2001) como também, o TNF- α e seus receptores estão presentes nas células foliculares ou no corpo lúteo de muitas espécies (Tabela 2), incluindo os bovinos (SAKUMOTO & OKUDA, 2004). Em ovários de ratas, os sítios de localização do TNF- α incluem oócitos (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1994), células da granulosa (ROBY *et al.*, 1989), células do corpo lúteo e macrófagos (SANCHO-TELLO *et al.*, 1993). Portanto, é provável que o TNF- α produzido localmente no ovário desempenhe um papel importante na regulação do

ESPÉCIES	Local de expressão do TNF- α	Locais de expressão de Receptor tipo I e tipo II de TNF- α
Bovina	CT, CL, CG*, CC*	CG, CT, CL, CE e CC*.
Suína	CL, macrófagos e CE.	CG, CLP e CLG.
Humana	CG, CT, CL.	Células ovarianas
Ovino	CE, CT e CL.	-
Roedor (rato)	CG	-
Roedor (camundongo)	CG, CT e CL.	-

desenvolvimento folicular ovariano em várias espécies (SAKUMOTO & OKUDA, 2004).

Tabela 2. Expressão de TNF- α e receptores de TNF- α (tipo I e tipo II) em ovários de várias espécies (Adaptado de SAKUMOTO & OKUDA, 2004).

CT: células da teca, CL: corpo lúteo, CE: células endoteliais, CG: células da granulosa, CLP: células luteais pequenas, CLG: células luteais grandes, CC: células do cumulus.

*Retirado de Silva *et al.*, (2017b).

O TNF- α tem uma variedade de efeitos sobre a foliculogênese em mamíferos. Estes efeitos incluem: (1) modulação da esteroidogênese pelas células da granulosa, teca e luteais, (2) envolvimento na regressão luteal, (3) envolvimento na ruptura do folículo ovariano, e (4) envolvimento na apoptose ovariana (CHUN *et al.*, 1998). Além de seus efeitos sobre a esteroidogênese, foi demonstrado que o TNF- α induz tanto a proliferação celular quanto a morte celular em cultivo de células da granulosa de grandes folículos antrais suínos (PRANGE-KIEL *et al.*, 2001). Adicionalmente, estudos apontam que o TNF- α , em associação a P4, pode interagir na regulação do crescimento de folículos primordiais (NILSSON *et al.*, 2006). Por outro lado, a adição de 10 ng/mL de TNF- α em meio de cultivo de folículos pré-antrais bovinos aumentou o número de células apoptóticas no tecido ovariano, e reduziu a sobrevivência folicular (SILVA *et al.*, 2017b). Além disso, Ma *et al.* (2010) observaram que a exposição de oócitos suínos a TNF- α (200 ng/mL) causa uma redução na maturação oocitária e anormalidades no alinhamento cromossômico. Yamamoto *et al.* (2015) mencionam que o TNF- α regula a ovulação através da diminuição do número de folículos liberados, induzindo a morte das células da granulosa via apoptose e autofagia. Além do mais, estudos mostram que o TNF- α inibe a secreção de estradiol, bem como a secreção de P4 em células da granulosa de ratos, suínos, bovinos e humanos (SPICER, 1998; VELDHUIS *et al.*, 1991; RICE *et al.*, 1996), o que evidencia a divergência quanto seu efeito benéfico sobre a foliculogênese. Na tabela 3, Silva *et al.*, (2017b) relataram a intensidade da expressão de TNF- α e seus receptores em folículos ovarianos em bovinos. Em folículos primordiais, primários, secundários e antrais pequenos, existem evidências de efeitos autócrinos e parácrinos de TNF- α durante o desenvolvimento folicular, com redução da sobrevivência folicular e aumento de células apoptóticas no tecido ovariano em bovinos (SILVA *et al.*, 2017b).

Tabela 3. Intensidade relativa da coloração imuno-histoquímica para as proteínas TNF- α ; TNFR-1 e proteína TNFR-2 em folículos ovarianos bovinos (Adaptado de Silva *et al.*, 2017b).

Estrutura	TNF-α	TNF-R1	TNF-R2
Primordial			
Oócito	+++	+++	++
Celulas da granulosa	-	-	-
Primário			
Oócito	+++	+++	++
Celulas da granulosa	-	-	-
Secundário			
Oócito	++	+++	+++
Celulas da granulosa	++	++	+++
Células da teca	-	-	++
Antrais pequenos < 3 mm			
Oócito	+++	+++	++
Cumulus	++	++	++
Granulosa mural	+++	+++	++
Células da teca	++	++	++
Antrais grandes > 3 – 6 mm			
Oócito	++	++	++
Cumulus	++	+++	++
Granulosa mural	++	+++	++
Células da teca	++	+++	++

(-) ausente; (+) fraco; (++) moderado; (+++) forte imunorreação.

Outra importante citocina pró-inflamatória é a IL-1 β , que pode estimular a proliferação de células T e, conseqüentemente, aumentar a produção de anticorpos (KOOL; FIERENS; and LAMBRECHT, 2012). A síntese de IL-1 β acontece principalmente pelos macrófagos e monócitos quando estimulados, mas podem ser sintetizados em menores quantidades em outros tipos de células como linfócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais (GABAY; LAMACCHIA; and PALMER, 2010). Em bovinos, Passos *et al.*, (2017) relataram que a IL-1 β e seus receptores, são expressos em folículos em vários estágios de desenvolvimento (Tabela 4).

Tabela 4. Intensidade relativa da coloração imuno-histoquímica para IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII e localização de mRNA para IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII em ovários de vacas (Adaptado de Passos *et al.*, 2017).

Estrutura	IL-1 β		IL-1RA		IL-1RI		IL-1RII	
	Proteína	RNAm	Proteína	RNAm	Proteína	RNAm	Proteína	RNAm
Primordial								
Oócito	+		-		+		+	
Granulosa	+		+/-		+		+/-	
Primário								
Oócito	+		-		+		+	
Granulosa	++		+/-		+		++	
Secundário								
Oócito	++		+/+		+/+		+	
Granulosa	+++	+*	++	+*	+/+	+*	+	+*
Teca	-		-		-		-	
Antrais pequenos < 3 mm								
Oócito	++	+	+/+	+	++	+	+	+
Cumulus	+++	+	+++	+	++	+	+++	+
Granulosa mural	+++		+++		++		+++	+
Teca	++		++		++		++	
Parede folicular		+		+		+		+
Antrais grandes > 3 – 6 mm								
Oócito	++	+	+/+	+	+	+	+	+
Cumulus	++	+	++	+	++	+	++	+
Granulosa mural	+++		+++		+++		+++	
Teca	++		++		++		++	
Parede folicular		+		+		+		+

*Folículos inteiros.

(-) ausente; (+/-) ocasionalmente encontrado; (+) fraco; (++) moderado; (+++) forte imunorreação

Para sintetizar o IL-1 β primeiramente seu precursor pro IL-1 β inativo é clivado no citoplasma em mIL-1 β ativo e NTP (peptídeo IL-1 β N-terminal) pela caspase 1 (enzima conversora da IL-1 β). A proteína acessória de receptor (IL-1RAcP) funciona como co-fator para haver a transdução de sinal no complexo. Vale ressaltar que o co-fator também é necessário para ativação pelo caminho da IL-18 e IL-33 (WEBER, 2010). Existem inibidores da IL-1 β como o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra) e o receptor do tipo II (IL-1RII) (DINARELLO, 2010). Além disso, é bastante provável que a IL-1 β esteja envolvida na regulação da meiose em COCs

equinos (MARTORIATI et al., 2003). Em humanos, o sistema IL-1 possui dois tipos de receptores (Figura 7), um receptor do tipo I (IL-1RI) com um domínio de 213 aminoácidos na região intracitoplasmática e um receptor do tipo II (IL-1RII) com apenas um domínio de 29 resíduos (ADASHI, 1998). O IL-1RII e o antagonista de IL-1R (IL-1Ra) são inibidores naturais que evitam respostas inflamatórias excessivas causadas pelo sistema IL-1 (GABAY, LAMACCHIA E PALMER, 2010). O receptor de IL-1 β é um complexo formado pelo receptor do tipo I e uma proteína acessória do receptor (IL-1RAcP) que formam um heterodímero de IL-1 (BORASCHI, 2013). O MyD88 atua como um adaptador ou regulador de maneira transitória no complexo de sinalização IL-1R (MUZIO *et al.*, 1997) e é capaz de recrutar a quinase do tipo 1 associada ao receptor de interleucina (IRAK1) e IRAK2 (WESCHE *et al.*, 1997). Além disso, o fator 6 associado ao receptor (TRAF6) é recrutado pelo IL-1R e requerido pela MyD88 para ativar NF- κ B (WU & ARRON, 2003). A via clássica do NF- κ B ocorre com a fosforilação de dois resíduos de serina (ser32 e ser36) da proteína I κ B pela atividade da quinase I κ B (IKK), a poliubiquitinalização do IKK β e depois degradação pelo proteossoma 26S, liberando dímeros do NF- κ B (p65 e p50) (NISHIKORI, 2005; KARIN & BEM-NERIAH, 2000). A ativação do NF- κ B depende de IKK β e possui um papel importante no controle transcricional da inflamação aguda e crônica (BONIZZI & KARIN, 2004). No entanto, estudos mostram que o NEMO e a IKK α induzida pela IL-1, mas não pelo TNF- α , é suficiente para ativação do NF- κ B sem necessitar do dímero IKK β (SOLT *et al.*, 2007). Assim, a IL-1 pode induzir tanto a via clássica através do IKK β quanto o IKK α através do NEMO (SOLT *et al.*, 2007; BONIZZI & KARIN, 2004; NISHIKORI, 2005). Seguindo a ativação pelo complexo IKK α , há a translocação do p52 e RelB para o núcleo (RAUERT *et al.*, 2010) e pelo complexo IKK β , a translocação do p65 e p50 (Figura 7) (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996).

No que tange ao papel da IL-1 β sobre a foliculogênese, Passos *et al.*, 2016 demonstraram que a suplementação do meio de cultivo nas concentrações de 10 e 50 ng/mL de IL-1 β promoveu o desenvolvimento e ativação de folículos primordiais bovinos. Além disso, a IL-1 β desempenha um papel no processo ovulatório e na maturação de oócitos equinos, sendo, no entanto, fatores adicionais necessários para completar a maturação citoplasmática (CAILLAUD *et al.*, 2005). Já se sabe que tanto a IL-1 β quanto o TNF- α induzem a ovulação em ratos e coelhos (MACHELON e EMILIE, 1997). Recentemente, foi observado que a concentração de 10 ng/mL de IL-1 β não afeta o período de maturação oocitária em suínos (WASIELAK *et al.*, 2017) e a

associação do TNF- α com a IL-4 favorecem o estabelecimento da população das células germinativas do ovário de mamíferos (VAN DEN HURK, 2005). Desta forma, o estudo da influência do TNF- α e da IL-1 β na maturação de oócitos bovinos provenientes de folículos antrais pequenos é de grande relevância.

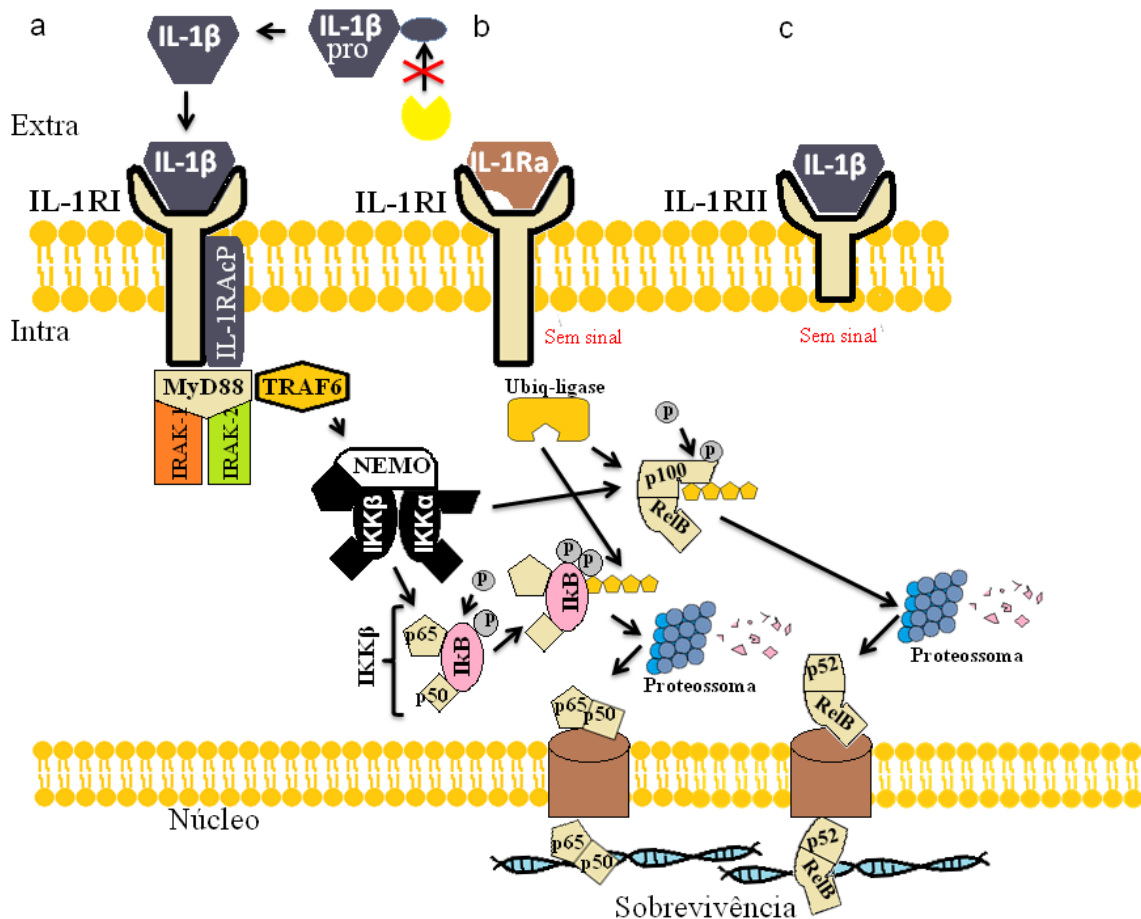


Figura 7. Vias de sinalização do sistema IL-1 β – (a) complexo de heterodímero do sistema IL-1 β capaz de promover transdução de sinal (via clássica pela estimulação do NEMO); (b) antagonista natural da IL-1 β (IL-1Ra) promovendo o bloqueio da transdução de sinal; (c) receptor tipo II (IL-1RII) inibindo a transdução de sinais pela pequena cadeia peptídica que não atravessa a membrana completamente.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios demonstraram que, oócitos bovinos com diâmetro inferior a 110 μm possuem um aumento de distúrbios citogenéticos na progressão meiótica (LECHNIACK, 2002), dificultando o alcance da completa maturação. Assim, é necessário compreender a regulação do desenvolvimento folicular e conseqüentemente do oócito, a fim de melhorar a eficiência da maturação oocitária em bovinos. Já foi relatado que o oócito de folículos pequenos *in vitro* precisa passar um período prévio de desenvolvimento na presença de fatores de crescimento, e também, de substâncias inibidoras da maturação nuclear, como a cilostamida, afim de bloqueiar a meiose e aumentar assim, o tempo para capacitação do oócito (GOTTARDI *et al*, 2009). Além disso, preconiza-se que os oócitos bovinos precisam crescer até atingir tamanho superior a 120 μm para adquirir capacidade de desenvolvimento embrionário (PAVLOK *et al*, 1992). Assim, o período de crescimento para oócitos bovinos de folículos antrais precoces antes da maturação é ideal para melhorar viabilidade, diâmetro, maturação e desenvolvimento do oócito (HUANG *et al.*, 2013). Após o crescimento, o oócito deve estar apto para passar pelas etapas de maturação nuclear, citoplasmática e molecular (CAMPOS, 2011; GONÇALVES, 2007).

Neste contexto, as citocinas possuem papel fundamental na modificação dos gametas femininos, e estão envolvidas nos processos desde a foliculogênese até a ovulação, destacando-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) que desempenham importante papel tanto na ovulação como na função folicular (CRESPO *et al*, 2012; TAKEHARA *et al*, 1994). Tanto essas citocinas como seus respectivos receptores, são expressos no oócito, células do cumulus, células da granulosa e células da teca em diferentes categorias foliculares (SILVA *et al.*, 2017b; PASSOS *et al.*, 2016), sendo provável sua contribuição para o desenvolvimento folicular desde a ativação folicular até a ovulação. No entanto, os efeitos destas substâncias em oócitos de folículos antrais pequenos ainda não são conhecidos, sendo necessário estudar o potencial do TNF- α e da IL-1 β de promover o crescimento *in vitro* de oócitos menores que 110 μm , afim de melhorar as taxas de maturação *in vitro* obtidas atualmente, com concomitante melhoria da qualidade do oócito maturado *in vitro*.

4. HIPÓTESE

1. As citocinas (IL-1 β e o TNF- α) promovem o crescimento e o aumento da taxa de maturação *in vitro* de oócitos derivados de folículos antrais pequenos (1-3 mm de diâmetro).
3. As citocinas (IL-1 β e TNF- α), quando adicionadas durante os períodos de pré-maturação e maturação de oócitos oriundos de folículos antrais pequenos, influenciam a distribuição mitocondrial.
4. As citocinas (IL-1 β e TNF- α) aumentam os níveis de expressão dos genes *GDF9*, *H1FOO*, *cMOS* e *ciclina B1* em oócitos cultivados *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos das citocinas (IL-1 β e TNF- α) durante o crescimento de oócitos provenientes de folículos antrais pequenos bovinos.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da IL-1 β e TNF- α isoladamente ou em associação, sobre o diâmetro dos oócitos cultivados *in vitro* por 48 horas;
- Avaliar os efeitos da IL-1 β e TNF- α isoladamente ou em associação, sobre os estágios da cromatina dos oócitos após os períodos de pré-maturação e maturação;
- Avaliar os efeitos da IL-1 β e TNF- α isoladamente ou em associação, sobre a distribuição mitocondrial nos oócitos cultivados *in vitro*;
- Avaliar os efeitos da IL-1 β e TNF- α isoladamente ou em associação, sobre a expressão relativa de RNA mensageiro para os genes GDF-9, c-MOS, ciclina B1 e H1foo, nos oócitos após a pré-maturação e maturação.

6. ARTIGO I

Influence of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha on the in vitro growth, maturation and mitochondrial distribution of bovine oocytes from small antral follicles

Artigo submetido na revista *Zygote*

Influence of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha on the *in vitro* growth, maturation and mitochondrial distribution of bovine oocytes from small antral follicles

F.E.O. Lima^a, F.T.G, Bezerra^a, G.B, Souza^a, M.H.T.Matos^b, R. van den Hurk^c and
J.R.V. Silva^a

^aBiotechnology Nucleus of Sobral, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

^b Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, UNIVASF, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

^c Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary 13 Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

Correspondence address: JRV Silva, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocéllo Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36118000. E-mail: jrvsilva@ufc.br

Abstract

This study aims to investigate the effects of IL1 β and TNF α on growth and maturation of oocytes from small follicles (1-3mm) during *in-vitro* culture. To this end, COCs with diameter of ~110 μ m were cultured in TCM-199 alone or supplemented with IL1 β (10ng/mL), TNF α (10ng/mL) or both for 48 h. The oocytes were measured at the beginning and at the end of culture period. COCs were cultured for 20h in pre-maturation medium and then, half of the COCs of each group was destined for *in-vitro* maturation and the remaining COCs were used to evaluate meiotic progression, mitochondrial distribution and the expression of mRNAs for GDF-9, c-Mos, Cyclin-B1

and H1foo. The results showed that COCs cultured with TNF α alone or together with IL1 β had higher diameters than those cultured in control medium alone or supplemented with IL1 β . Control oocytes isolated from large antral follicles (> 5mm) had heterogeneous distribution of mitochondria. Oocytes isolated from small antral follicles, that had been grown *in vitro* in TCM-199 alone or supplemented with TNF α had similar heterogeneous mitochondrial distribution prior to IVM. After IVM, mitochondria were heterogeneously distributed, when cultured in TCM-199. However, when cultured in TNF α and/or IL1 β , mitochondria were homogeneously distributed. Presence of TNF α and/or IL1 β in TCM-199 culture medium did not influence the expression of mRNAs for GDF-9, c-Mos, Cyclin-B1 and H1foo. In conclusion, TNF α and a mixture of TNF α and IL1 β both stimulate growth of bovine oocytes during their *in-vitro* culture, but do not influence gene expression in grown oocytes.

Keywords: cytokines, TNF α , IL1 β , maturation, antral follicle, bovine

Introduction

It is known that oocytes from small antral follicles (<3.0 mm) have low competence to be matured *in vitro* and to assure early embryo development. Recently, Labrecque et al. (2016) reported that the transcriptome of bovine oocytes from small follicles is very different from oocytes from large follicles (5-8 mm). As a consequence, only fully grown oocytes are efficiently matured *in vitro*, whereas oocytes from small antral follicles are discarded because of their limitations to be successfully matured *in vitro* (Dang-Nguyen et al., 2017). Thus, *in-vitro* culture of these oocytes, prior to *in-vitro* maturation, could allow the synthesis and storage of transcripts and proteins that are involved with resumption of meiosis. To avoid meiosis resumption during this pre-

maturation period, Bezerra et al. (2016) reported that most of the oocytes, from bovine antral follicles of 3 to 8 mm, cultured in presence of cilostamide remained at germinal vesicle (GV) stage. In addition, swine oocytes from antral follicles <3 mm increased their diameter and reach around 120µm after culture in presence of cilostamide (Lee et al., 2017). Thus, it has been hypothesized that inhibition or delay of spontaneous nuclear maturation *in vitro* would allow more time for oocyte accumulation of molecules that are important for early embryo development, which could potentially improve the efficiency of *in-vitro* embryo production (Bilodeau-Goeseels, 2012).

Previous studies have shown that transcripts, such as *GDF9*, *Hlfoo*, *Cyclin B1* and *cMos*, are stored in the oocyte and have important roles during oocyte maturation and early embryo development. It has been reported that GDF9 appears to be a key regulator involved in the development of oocytes at all stages and at ovulation (Castro, Cruz and Leal, 2016). In cattle, the overexpression of oocyte-specific linker histone (*Hlfoo*) stimulates the maturation process, showing its essentialness for oocyte maturation (Yun et al. 2014). Reduction of Cyclin B levels might cause maturation promoting factor (MPF) destabilization (Tiwari and Chaube, 2017). The c-Mos has a role in regulating the assembly of the spindle during meiotic oocyte division in murine species (Zhao et al., 1991). Thus, evaluation of the levels of these transcripts after pre-maturation may be an indicator of oocyte competence in the bovine species. Moreover, there is a progressive increase of mitochondria during oogenesis, which is essential for the production of ATP to assure cytoskeletal and cytoplasmic organization during resumption of meiosis and oocyte competence (Cotterill et al., 2013). Furthermore, a slight change in homogeneous mitochondrial distribution in germinal vesicle (GV) to an aggregate of mitochondria in MII was reported in mice oocytes that had been matured *in*

vitro (Nazmara et al., 2014). This indicates that a chosen culture environment might have an influence on the location of mitochondria.

Various substances, like IL1 β and TNF α , can influence oocyte growth and transcript storage *in vitro*. It is known that IL-1 and its receptors are expressed in different compartments within the oocyte and granulosa cells of bovine antral follicles and that 10 ng/mL IL1 β stimulates activation of primordial follicles during *in-vitro* culture (Passos et al., 2016). IL1 β also modulates the *in-vitro* proliferation of granulosa cells from antral follicles (murine: Karakji and Tsang, 1995, bovine: Baratta et al., 1996). Furthermore, Martoriati et al. (2003) reported that IL1 β is probably involved in the regulation of equine oocyte meiotic resumption. TNF α and its receptors are also expressed in bovine antral follicles and TNF α maintained the ultrastructure of cumulus cells during *in vitro* culture of bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) (Silva et al., 2017a). In human, TNF α and its type II receptor are both transcribed and translated in the oocyte and cumulus cells (Naz et al., 1997). Yan et al. (1993) reported that 10ng/mL TNF α stimulates human granulosa cell proliferation and steroidogenesis. TNF α and IL1 β bind to different cell membrane receptors, but they have a great number of activities in common, especially during remodeling of bone and cartilage and in the regulation of fever, inflammation, fibroplasia, and angiogenesis (reviewed by Oppenheim et al., 1989). These authors have reported that TNF α and IL1 β have synergistic *in vivo* radioprotective effects and *in vitro* terminal differentiative effects on tumor cell lines. However, it is still unknown if IL1 β , TNF α or both interact and influence oocyte growth and gene expression during the culture of bovine oocytes from small antral follicles. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of IL1 β and TNF α on growth, maturation, gene expression and mitochondrial distribution in cultured bovine oocytes, isolated from small bovine antral follicles.

Materials and Methods

Collection and transport of bovine ovaries

Bovine ovaries (n = 160) were obtained from a slaughterhouse and transported to the laboratory in saline solution (0.9 % NaCl) containing antibiotics (100 IU / mL penicillin and 50 µg / mL streptomycin sulfate) at 30 ° C, within a maximum period of 1 h.

Oocyte collection

In the laboratory, the ovaries were washed in saline solution and COCs were aspirated from small antral follicles (1–3 mm in diameter) using a 21 gauge needle connected to a sterile syringe. Under a stereomicroscope, COCs were recovered and selected according to Leibfried and First (1980). After morphological evaluation, grade 1 and 2 COCs with a visible compact and intact cumulus and a dark cytoplasm were selected for culture.

Growth, pre-maturation and maturation of oocytes *in vitro*

For *in vitro* culture, the control medium was TCM-199 supplemented with 4 % polyvinylpyrrolidone (PVP), 1µg/mL estradiol, 4 mM hypoxanthine, 0.2 mM pyruvic acid, 2.2 mg / mL sodium bicarbonate, 5.0 mg / mL LH (Lutropin[®]-V, Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.5 mg / mL FSH (Folltropin[®]-V, Bioniche, Belleville, ON, Canada), 5 % fetal bovine serum and 100 IU / mL penicillin and 50 mg / mL streptomycin sulfate. The growth medium composition was according to a protocol described previously by Huang (2013), with modifications. The COCs were cultured individually in 96-well plates with 150 µL in each well for 48 h in control medium

alone or supplemented with 10 ng / mL IL1 β (Passos et al., 2016), 100 ng / mL TNF α (Silva et al., 2017) or both. In each treatment, 109 to 115 oocytes were cultured *in vitro*. After the growth period, two perpendicular measurements were performed in the oocytes using an inverted microscope with NIS Elements 4.2 software (Nikon, Nikon Instruments Inc., Japan). Then, morphologically normal COCs from each treatment were destined to *in-vitro* pre-maturation.

The *in-vitro* pre-maturation medium (pre-IVM) was TCM-199 containing Earle's salts and L-glutamine (Sigma) supplemented with 0.2 mM pyruvic acid, 5.0 μ g / mL LH (Lutropin[®]-V, Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.5 μ g/mL FSH (Folltropin[®]-V, Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.4 % BSA, 10 μ M of cilostamide and 100 IU / mL penicillin and 50 μ g / mL streptomycin sulfate (Bezerra et al., 2016). The COCs were cultured individually in 96-well plates for 20 h d at 38.5°C, with 5% CO₂ in air and then, the COCs were destined for *in-vitro* maturation or for the evaluation of meiotic progression, as described previously by (Bezerra et al. (2016) and Hirao et al. (2004).

The maturation medium for the treatments was the same medium that was used during pre-maturation without cilostamide. The COCs were cultured individually for 22 h (Bezerra et al., 2016; Hirao et al., 2004), and all were intended for evaluation of meiotic progression.

Evaluation of meiotic progression and mitochondrial distribution

To evaluate meiotic progression after culture, the cumulus cells were removed by vortexing and the oocytes were fixed in 4 % paraformaldehyde for 15 min and transferred to 0.1 % Triton X-100. The chromatin configuration was observed after addition of 10 μ g / mL Hoechst 33342 under an epifluorescent inverted microscope

(Leica, DMI4000B). Oocytes were classified according to the nuclear maturation stage as germinal vesicle (GV) or germinal vesicle break-down (GVBD).

For analysis of the mitochondrial distribution before and after maturation, 20 oocytes per treatment were stripped and incubated in a solution containing 100 nM Mito Tracker Red (SIGMA) for 45 min at 38 °C in a saturated humidity atmosphere containing 5 % CO₂ and 95 % air. Thereafter, the oocytes were analyzed under an epifluorescent inverted microscope (Leica, DMI4000B). Oocytes collected from large antral follicles (> 5 mm in diameter) were used as fresh control. The mitochondrial distribution pattern in each oocyte was classified as (i) heterogeneous – mitochondria distributed unevenly within the oocyte cytoplasm, (ii) homogeneous – mitochondria distributed throughout the entire oocyte and (iii) peripheral – mitochondria distributed only in the periphery of the oocyte.

RNA extraction, reverse transcription and real time PCR

A total of 240 oocytes (n=60 per treatment) were used for real-time PCR. Total RNA was extracted from pools of oocytes by using the TRIzol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil), according to manufacturer's instruction. Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70 °C and then cooled in ice. The reverse transcription was performed in a total volume of 20 mL composed of 10 mL of sample RNA, 4 mL reverse transcriptase buffer (Invitrogen), 8 units RNAsin, 150 units of reverse transcriptase SuperscriptIII, 0.036 U random primers, 10 mM DTT and 0.5 mM of each dNTP (Invitrogen). The mixture was incubated at 42 °C for 1 h, subsequently at 80 °C for 5 min and finally stored at 20 °C. The negative control was prepared under the same conditions, but without addition of reverse transcriptase.

To quantify the levels of mRNA for *GDF-9*, *Cyclin-B1*, *cMos* and *Hlfoo*, each reaction in real time (20 μ L) containing 10 μ L of SYBR Green Master Mixs (Applied Biosystems, Warrington, UK), 7.3 μ L of ultra pure water, 1 μ L of cDNA and 5 mM of each primer. Real-time PCR was performed in a thermocycler (Applied Biosystems, Warrington, UK). The primers designed to perform amplification of mRNA for *GDF-9*, *Cyclin-B1*, *cMos* and *Hlfoo* are shown in Table 1. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as endogenous controls for normalization of messenger RNA expression. GAPDH was successfully used as housekeeping gene in bovine oocytes (Silva et al., 2017a).

Table 1. Primer pairs used to real-time PCR.

Target gene	Primer sequence (5´- 3´)	Sense (s), anti- sense (As) GenBank accession no.	
		sense (s)	no.
<i>GAPDH</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	S	BC102589.1
	ACGCCTGCTTCACCACCTTC	As	
<i>GDF9</i>	ACAACACTGTTCGGCTCTTCACCC	S	GI:51702523
	CCACAACAGTAACACGATCCAGGTT	As	
<i>C-Mos</i>	CTGCAAGATCGGGGACTTCG	S	AY:168496.1
	CTCGGTGAGTGTAGGTGCCA	As	
<i>HlFoo</i>	CCCAAGAAGCCGAGTGAGTC	S	NM: 001035372.1
	CTTGGTATCTGCTTGGCGGC	As	
<i>Cyclin-B1</i>	CTCCAGTGCTCTCCTCCTCACT	S	NM:001045872.1
	CTAATCTTCGTGTTCTGGTGATCC	As	

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 seconds at 95 °C, 30 seconds at 58 °C, and 30 seconds at 72 °C. The final extension was for 10 seconds at 72 °C. Primer efficiency was determined using serial dilutions of the target cDNA. All reactions were performed in triplicate. The negative control was prepared under the same conditions but without addition of cDNA. The

delta-delta-CT method was used to transform CT values into normalized relative messenger RNA expression levels (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 6 software. Paired T-test was used to compare oocyte diameters before and after culture. ANOVA with Kruskal-Wallis test were used to compare the average oocyte growth, and the levels of mRNA in oocytes cultured in the different treatments. The percentages of oocytes at GV or GVBD after pre-maturation and maturation in each treatment were compared by Chi-Square. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effects of IL1 β and TNF α on oocyte growth during the culture of COCs

After culturing COCs for 48 h in TCM-199 alone (n = 114) or supplemented with IL1 β (n = 113), TNF α (n = 110) or both cytokines (n = 108), a significant increase in diameter of oocytes was observed when compared to time zero (Figure 1, $p < 0.05$). Additionally, oocytes from COCs cultured in medium supplemented with TNF α alone or both TNF α and IL1 β had larger average growth than those cultured in control medium alone or supplemented with IL1 β (Figure 2). A positive interaction between TNF α and IL1 β was observed, since oocytes cultured in the presence of both substances had larger average growth than those cultured either with TNF α or IL1 β (Figure 2).

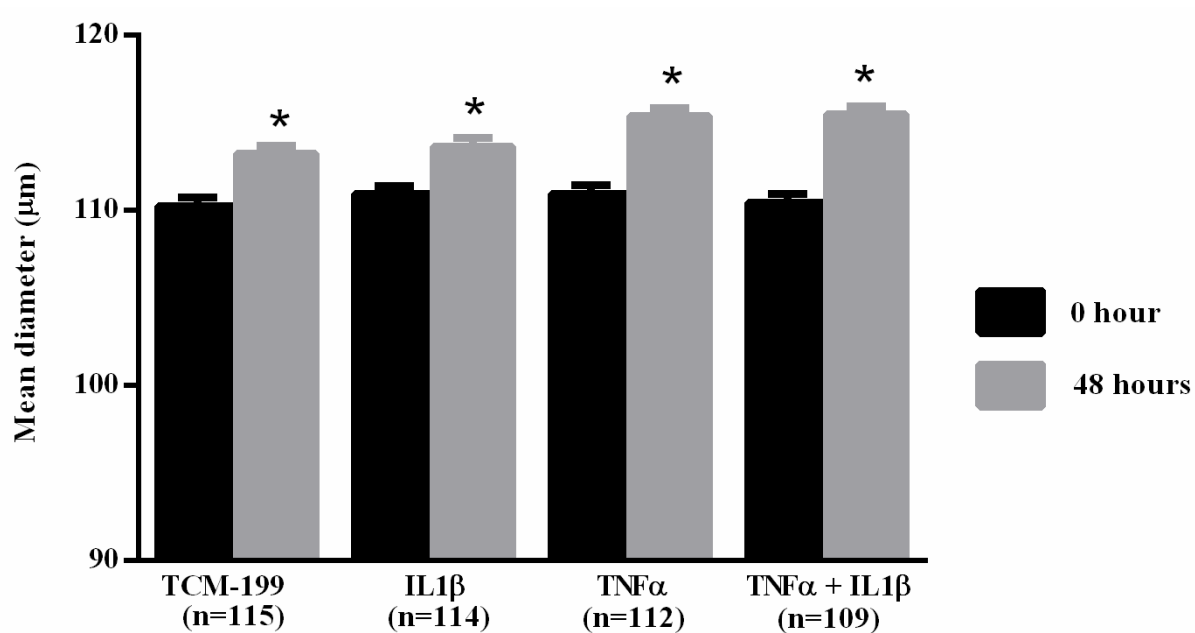


Figure 1. Mean diameter of oocytes cultured in TCM-199 alone or supplemented with IL1 β , TNF α and both IL1 β and TNF α for 0 and 48 hours.

ab – Significant difference between 0 and 48 h within the same treatment ($P < 0.05$).

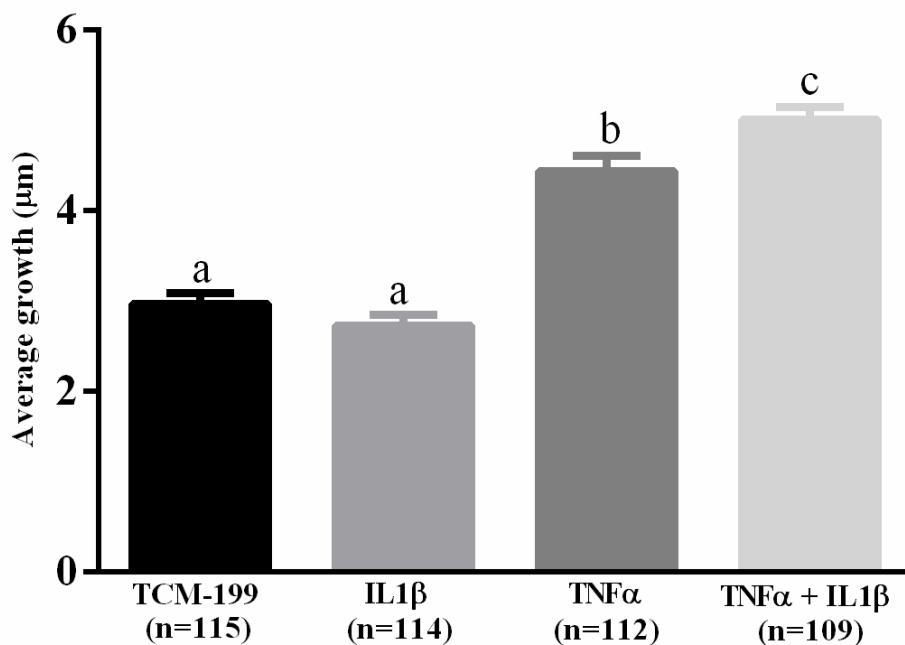


Figure 2. Average growth of oocytes cultured in TCM-199 alone or supplemented with IL1 β , TNF α and both IL1 β and TNF α for 48 hours.

abc – Significant difference among treatments ($P < 0.05$).

Pre-maturation and maturation of *in-vitro* grown oocytes

After the growth period of oocytes, COCs were pre-matured for 20 h in medium supplemented with cilostamide. As shown in Table 2, after pre-maturation, the percentage of oocytes at GV stage varied from 47.0 to 65.0 %, while no significant effect of TNF α , IL1 β or both TNF α and IL1 β treatments on meiosis resumption was observed. After the *in vitro* maturation period, a significant reduction in the percentages of oocytes at GV was observed, which was accompanied by a significant increase in the percentages of oocytes showing meiosis resumption, but no significant differences among treatments were seen (Table 2).

Table 2. Percentage of oocytes in germinal vesicle (GV) and resumption of meiosis after pre-maturation and *in-vitro* maturation (IVM).

In vitro growth medium	Pre-maturation		IVM	
	GV (%)	GVBD (%)	GV (%)	GVBD (%)
TCM-199	64.7 (22/34) ^a	35.3 (12/34) ^c	20.0 (6/30) ^b	80.0 (24/30) ^d
IL1β	50.0 (16/32) ^a	50.0 (16/32) ^c	22.5 (7/31) ^b	77.4 (24/31) ^d
TNFα	47.2 (17/36) ^a	52.7 (19/36) ^c	12.5 (4/32) ^b	87.5 (28/32) ^d
IL1β + TNFα	59.3 (19/32) ^a	40.6 (13/32) ^c	16.1 (5/31) ^b	83.8 (26/31) ^d

ab – Significant difference between the percentages of oocytes at GV or GVBD after pre-maturation and maturation ($P < 0.05$).

cd – Significant difference between the percentages of oocytes at GVBD after pre-maturation and maturation ($P < 0.05$).

Expression of mRNA for *GDF-9*, *cMos*, *Hlfoo* and *Cyclin-B1*

Figure 3 shows that TNF α , IL1 β and both TNF α and IL1 β did not influence the mRNA expression for *GDF-9*, *Cyclin-B1*, *cMos* and *Hlfoo* after culture of COCs.

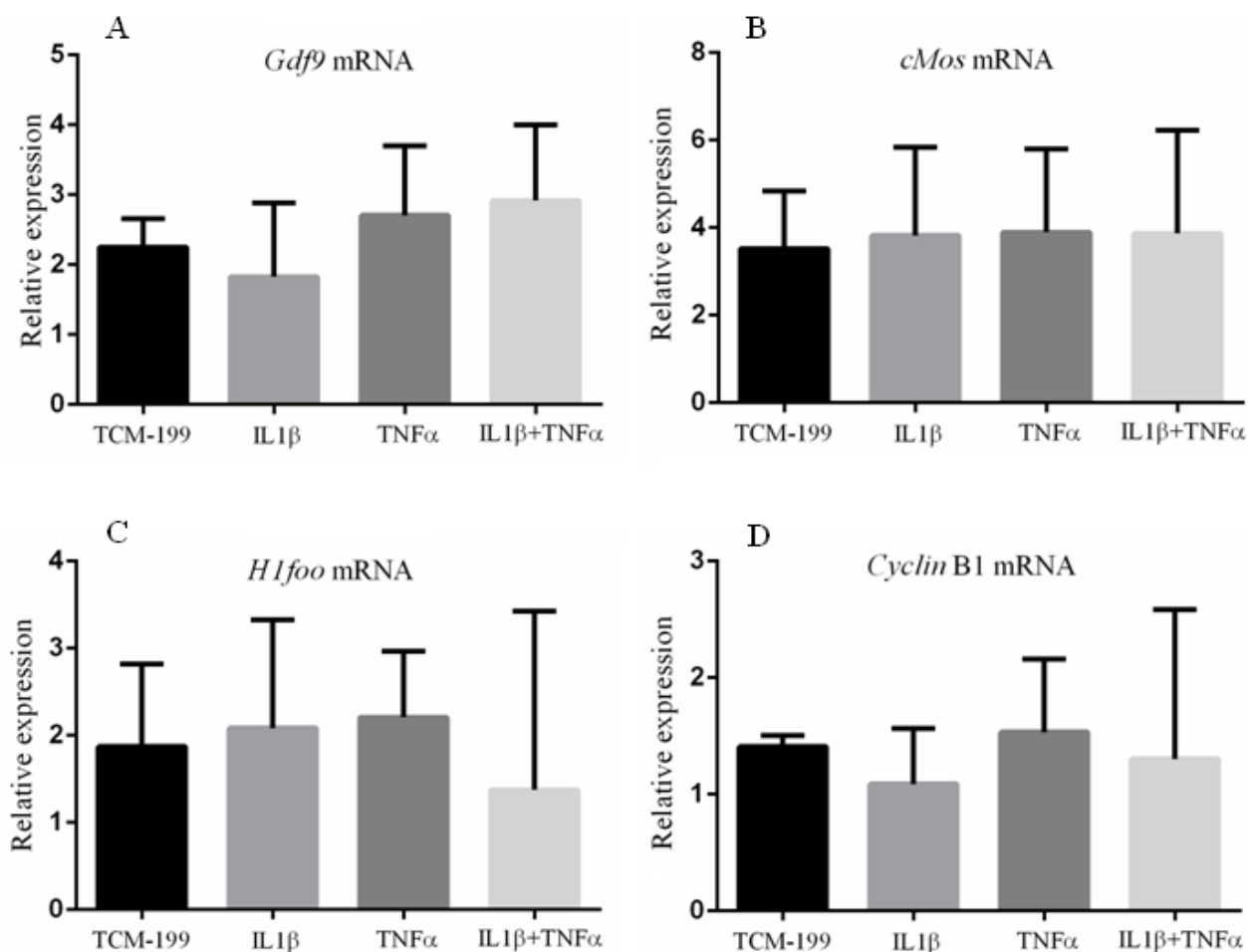


Figure 3. Expression of mRNA for (A) GDF-9; (B) c-Mos; (C) H1FOO; (D) Cyclin-B1 in bovine oocytes that had been grown in TCM-199 alone or supplemented with IL-1 β , TNF α and both IL-1 β and TNF α for 48 hours and pre-matured for 20 hours.

Mitochondrial distribution in oocytes before and after pre-maturation and IVM

Control oocytes from large antral follicles (> 5 mm) had a heterogeneous pattern of mitochondrial distribution (Figure 4a). However, in control oocytes from small antral follicles (1-3 mm), mitochondria were homogeneously distributed (Figure 4a). After pre-maturation of COCs in control medium alone or supplemented with TNF α , mitochondria were heterogeneously distributed throughout oocytes. After maturation, mitochondria were homogeneously distributed in oocytes, except for those grown in control medium, in which the mitochondria were heterogeneously distributed. Table 3

shows the mitochondrial distribution in the control oocytes or in those that underwent pre-maturation or *in-vitro* maturation.

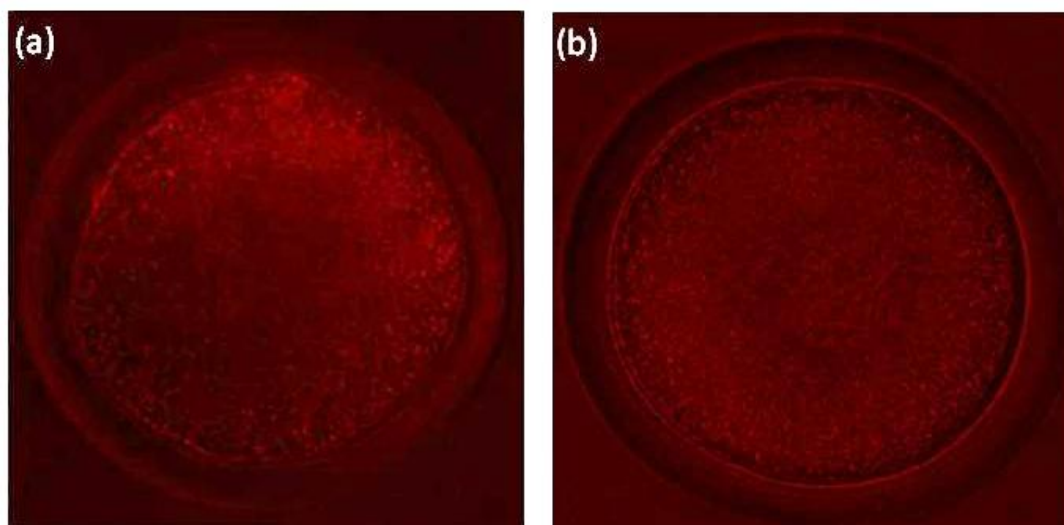


Figure 4. Oocytes with different types of mitochondrial distribution. A) Oocytes from large antral follicles with heterogeneously distributed mitochondria. B) Oocytes from small antral follicles with homogeneously distributed mitochondria. Original magnification 400x.

Discussion

This study shows for the first time that $TNF\alpha$ and both $TNF\alpha$ and $IL1\beta$ promote oocyte growth *in vitro*. Recently, Silva et al. (2017a) has shown that, in cattle, $TNF\alpha$ and its receptors ($TNFR1$ and $TNFR2$) are expressed in bovine oocytes. In humans, $TNF\alpha$ expression increases gradually during follicular phases (Zolti, et al., 1992). Although $IL1\beta$ did not promote significant bovine oocyte growth in our study, Takehara et al. (1994) reported that this substance is involved in the regulation of rabbit oocyte meiotic resumption. In addition, $IL1\beta$ is known to act as a paracrine factor, which is involved in the cascade of events that lead to ovulation (Bem-Shlomo et al., 1994). Moreover, oocytes and granulosa cells from bovine follicles express the proteins for $IL1\beta$, IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) and the IL-1 receptors IL-1RI and IL-1RII (Passos et al., 2016).

Table 3. Mitochondrial distribution of fresh oocytes at time zero and after pre-maturation and maturation in vitro of oocytes that had been previously grown in TCM-199 alone or supplemented with IL-1 β , TNF α and both IL-1 β and TNF α for 48 hours.

Control oocytes –time zero	Homogeneous	Heterogeneous
Oocytes from large follicles (> 5mm)		X
Oocytes from small follicles (< 3 mm)	X	
<i>In-vitro</i> growth medium	After <i>in-vitro</i> pre-maturation	
TCM-199		X
TCM-199 + IL-1 β	X	
TCM-199 + TNF α		X
TCM-199 + IL-1 β + TNF α	X	
<i>In-vitro</i> growth medium	After <i>in-vitro</i> maturation	
TCM-199		X
TCM-199 + IL-1 β	X	
TCM-199 + TNF α	X	
TCM-199 + IL-1 β + TNF α	X	

During pre-maturation, high percentages (47-65 %) of oocytes were kept at the GV stage. A previous study, using this same medium composition and bovine oocytes from large bovine antral follicles (3-8 mm in diameter), had shown that 36 % oocytes remained at the GV stage after 12 hours of culture (Bezerra et al., 2016). The findings show that blockade of meiosis resumption with cilostamide is more efficient in COCs of small antral follicles. Maintenance of oocytes at GV is very important, since it is during meiotic arrest that the oocytes undergo structural and molecular modifications, including redistribution of organelles, storage of RNAs and messenger proteins (Crocomo et al., 2015).

After maturation of COCs that had been grown and pre-maturated in vitro, the GVBD rate ranged from 78.0 to 88.0 % (Table 2). Supplementation of culture medium

with $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ or both did not significantly influence the rate of GVBD. Regarding to oocytes of large follicles, previous studies have shown that $\text{IL1}\beta$ induces GVBD in rabbit oocytes (Takehara et al., 1994). In equine species, in vivo intrafollicular injection of $\text{IL1}\beta$ induced ovulation, but this substance was unable to induce cortical granules migration and remodelling of mitochondria, that commonly occurs during oocyte maturation (Caillaud et al., 2005). In addition, in vitro studies have shown that $\text{IL1}\beta$ had not positive effect on equine oocyte nuclear maturation (Martoriati et al., 2003). Studies have also suggested that $\text{TNF}\alpha$ may stimulate oocyte maturation and may represent an intraovarian mediator of the effects of LH on the maturation of fish oocytes (Crespo et al., 2012). On the other hand, exposure of porcine oocytes to $\text{TNF}\alpha$ caused a reduction in their maturation from GV stage to MII stage and increased the proportion of oocytes with abnormal chromosome alignment and cytoskeleton structure (Ma et al., 2010). In bovine species, $\text{TNF}\alpha$ had an inhibitory effect on both in vitro oocyte maturation and embryo development (Jackson et al., 2012). These data shows that the effects of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL1}\beta$ depends on species and the stage of oocyte development.

Our results furthermore showed that $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ or both did not influence the mRNA levels for *GDF9*, *c-Mos*, *H1foo* and *Cyclin-B1* in cultured oocytes. This might explain the absence of a positive effect of $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ or both on the rates of GVBD. For, previous studies have shown that GDF-9 plays an important role during the development of follicular cells (Hussein et al., 2006), whereas c-Mos is important for the regulation of meiotic spindle assembly (Zhao et al., 1991). Moreover, H1foo is expressed during the GV stage especially and its presence is essential for oocyte maturation (Kunitomi et al., 2016). Finally, Cyclin-B1 is a subunit that forms the meiosis promoter factor (MPF), responsible for the onset of nuclear maturation (Bilodeau-Goeseels, 2012).

Control oocytes from large antral follicles (> 5 mm) have a predominant heterogeneous mitochondrial distribution. This distribution was also seen in pre-matured oocytes that had been grown *in vitro* in TCM-199 alone or supplemented with TNF α . After IVM, mitochondrial distribution remained heterogeneous only in oocytes that were cultured in TCM-199 medium lacking cytokines. Previous studies have recently shown that mitochondria in human oocytes at GV stage have heterogeneous distribution, but after GVBD, this configuration changed rapidly to a homogeneous distribution (Takahashi et al., 2016). In contrast, cat oocytes either in GV or MII predominantly have mitochondria distributed in the peripheral region (Sowińska et al., 2017). In sheep, migration of mitochondria to the periphery of the oocyte was observed after 6 h of IVM in COCs from follicles with a diameter of approximately 2 mm (Máximo et al., 2012). In general, in mammalian oocytes at the GV stage, mitochondria are found predominantly in the periphery of the cytoplasm, and with small groups scattered more to the center of the oocyte (Hyttel et al., 1997; Sun et al., 2001). In oocytes at the MII stage, the mitochondria occupy a more centralized position in the cytoplasm (Hyttel et al., 1997; Sun et al., 2001; Adona et al., 2008). Our results point to a homogeneous distribution after IVM of bovine oocytes treated with IL1 β , TNF α or both cytokines, suggesting an important role of these compounds in the regulation of cytoplasmic maturation, and in the distribution of mitochondria especially.

In conclusion, TNF α and both TNF α and IL1 β promote the *in-vitro* oocyte growth during a 48 h culture period, but this growth had no positive effect on the maturation of oocytes from small follicles. In addition, these cytokines do not influence expression of mRNAs for *GDF-9*, *c-Mos*, *cyclin B1* and *Hlfoo* in the oocyte. TNF α has, however, an effect on the distribution of mitochondria in pre-matured oocytes.

Acknowledgments

This research was supported by grant from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number 552376/2011-6).

Ethical Standards

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional guides on the care and use of laboratory animals.

References

- Adashi, E. Y. (1998). The potential role of interleukin-1 in the ovulatory process: An evolving hypothesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **140**, 77–81.
- Adona, P. R., Pires, P. R. L., Quetglas, M. D., Schwarz, K. R. L., Leal, C. L. V. (2008). Nuclear maturation kinetics and in vitro embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone. I. combined or not combined with roscovitine. *Animal Reproduction Science* **104**, 389-397.
- Baratta, M., Basini, G., Bussolati, S., Tamanini, C. (1996). Effects of interleukin-1 beta fragment (163-171) on progesterone and estradiol-17 beta release by bovine granulosa cells from different size follicles. *Regul. pept.* **67**, 187-194.
- Ben-Shlomo, I.; Adashi, E. Y. (1994). Interleukin-1 as a mediator of the ovulatory sequence. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **1**, 187–191.
- Bezerra, F. T. G., Silva, A. W. B., Rissi, V. B., Rosa, P. A., Cesaro, M. P., Costa, J. J. N., Gonçalves, P. B. D., Silva, J. R. V. (2016). Cilostamide and follicular hemisections inhibit oocyte meiosis resumption and regulate gene expression and cAMP levels in bovine cumulus-oocyte complexes. *Livest. Sci.* **184**, 112–118.
- Bilodeau-Goeseels, S. (2012). Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? *Reprod. Domest. Anim.* **47**, 687-693.
- Caillaud, M., Duchamp, G., Gérard, N. (2005). In vivo effect of interleukin-1beta and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3**, 26.
- Castro, F. C., Cruz, M. H., Leal, C. L. (2016). Role of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and their importance in mammalian female fertility - a review. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* **29**, 1065-1074.

- Coticchio, G., Canto, M. Dal., Renzini, M. M., Guglielmo, M. C., Brambillasca, F., Turchi, D., Novara, P. V., Fadini, R. (2015). Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum. Reprod. Update* **21**, 427–454.
- Cotterill, M., Harris, S. E., Fernandez, E. C., Lu, J., Huntriss, J. D., Campbell, B. K., Picton, H. M. (2013). The activity and copy number of mitochondrial DNA in ovine oocytes throughout oogenesis in vivo and during oocyte maturation in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* **19**, 444–450.
- Crawford, J. L., McNatty, K. P. (2012). The ratio of growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Mol. Cell. Endocrinol.* **348**, 339–343.
- Crespo, D., Mañanós, E. L., Roher, N. MacKenzie, S. A., Planas, J. V. (2012). Tumor necrosis factor alpha may act as an intraovarian mediator of luteinizing hormone-induced oocyte maturation in trout. *Biol. Reprod.*, **86**, 1-12.
- Crocomo, L. F., Marques Filho, W. C., ULIAN, C. M. V., Branchini, N. S., Silva, D. T., Ackermann, C. L., Landim-Alvarenga, F. C., Bicudo, S. D. (2015). Effect of oil overlay on inhibition potential of roscovitine in sheep cumulus-oocyte complexes. *Reprod. Domest. Anim.* **50**, 410–416.
- Dang-Nguyen, T. Q., Appeltant, R., Somfai, T., Ishihara, S., Men, N. T., Santos, E. C. S., Noguchi, J., Kaneko, H., Kikuchi, K. (2017). Improvement of the developmental competence of porcine oocytes collected from early antral follicles by cytoplasm fusion. *J. Reprod. Dev.* **63**, 59-65.
- Gabay, C., Lamacchia, C., Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 232–241.
- Guimarães, A. L. S., Pereira, S. A., Kussano, N. R., Dode, M. A. N. (2016). The effect of pre-maturation culture using phosphodiesterase type 3 inhibitor and insulin, transferrin and selenium on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Zygote* **24**, 219-229.
- Hirao, Y., Itoh, T., Shimizu, M., Iga, K., Aoyagi, K., Kobayashi, M., Kacchi, M., Hoshi, H., Takenouchi, N. (2004). In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biol. Reprod.* **70**, 83–91.
- Huang, W., Nagano, M., Kang, S. S., Yanagawa, Y., Takahashi, Y. (2013). Effects of in vitro growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. *Theriogenology* **80**, 793–799.
- Hussein, T. S., Thompson, J. G., Gilchrist, R. B. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.* **296**, 514–521
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* **47**, 23-32.

- Jackson, L. R., Farin, C. E., Whisnant, S. (2012). Tumor necrosis factor alpha inhibits in vitro bovine embryo development through a prostaglandin mediated mechanism. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **3**: 7.
- Karakji, E. G., Tsang, B. K. (1995). Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. *Biol. Reprod.* **53**, 1302-1310.
- Kol, S., Donesky, B. W., Ruutiainen-Altman, K., Ben-Shlomo, I., Irahara, M., Ando, M., Rohan, R. M., Adashi, E. Y. (1999). 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.* **61**, 274-282.
- Kona, S. S., Praveen Chakravarthi, V., Siva Kumar, A. V., Srividya, D., Padmaja, K., Rao, V. H. (2016). Quantitative expression patterns of GDF9 and BMP15 genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured *in vitro*. *Theriogenology* **85**, 315-322.
- Kunitomi, A., Yuasa, S., Sugiyama, F., Saito, Y., Seki, T., Kusumoto, D., Kashimura, S., Takei, M., Tohyama, S., Hashimoto, H., Egashira, T., Tanimoto, Y., Mizuno, S., Tanaka, S., Okuno, H., Yamazawa, K., Watanabe, H., Oda, M., Kaneda, R., Matsuzaki, Y., Nagai, T., Okano, H., Yagami, K. I., Tanaka, M., Fukuda, K. (2016). H1FOO has a pivotal role in qualifying induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **6**, 825-833.
- Labrecque, R., Fournier, E., Sirard, M. A. (2016). Transcriptome analysis of bovine oocytes from distinct follicle sizes: insights from correlation network analysis. *Mol. Reprod. Dev.* **83**, 558-69.
- Lee, H., Elahi, F., Lee, J., Lee, S. T., Hyun, S. H., Lee, E. (2017). Supplement of cilostamide in growth medium improves oocyte maturation and developmental competence of embryos derived from small antral follicles in pigs. *Theriogenology* **91**, 1-8.
- Leibfried, L., First, N. L., 1980. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biol. Reprod.* **23**, 705-709.
- Luciano, A. M., Franciosi, F.; Modina, S. C., Lodde, V. (2011). Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through camp-dependent mechanism(s). *Biol. Reprod.* **85**, 1252-1259.
- Ma, C. H., Yan, L. Y., Qiao, J., Sha, W., Li, L., Chen, Y., Sun, Q. Y. (2010). Effects of tumor necrosis factor-alpha on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. *Fertil Steril* **93**, 920-926.
- Machelon, V., Emilie, D. (1997). Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary. *Eur. Cytokine Netw.* **8**, 137-43.
- Martoriati, A., Caillaud, M., Goudet, G., Gérard, N. (2003). Inhibition of in vitro maturation of equine oocytes by interleukin 1 via specific IL-1 receptors. *Reproduction* **126**, 509-515.
- Máximo, D. M., Martins Da Silva, I. G., Mondadori, R. G., Neves, J. P., Lucci, C. M. (2012). Ultrastructural characteristics of sheep oocytes during in vitro maturation (IVM). *Small. Rumin. Res.* **105**, 210-215.

- Naz, R.K., Zhu, X., Menge, A.C. (1997). Expression of tumor necrosis factor- α and its receptors type I and type II in human oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **47**, 127–133.
- Oppenheim, J. J., Matsushima, K., Yoshimura, T., Leonard, E. J., Neta, R. (1989). Relationship between interleukin I (IL1), tumor necrosis factor (TNF) and a neutrophil attracting peptide (NAP-I). *Agents Actions* **26**, 134-140.
- Passos, J. R. S., Costa, J. J. N., Cunha, E. V., Silva, A. W. B., Ribeiro, R. P., Souza, G. B., Barroso, P. A. A., Dau, A. M. P., Saraiva, M. V. A., Gonçalves, P. B. D., Van Den Hurk, R., Silva, J. R. V. (2016). Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1b on primordial follicle activation and survival in vitro. *Domest. Anim. Endocrinol.* **54**, 48–59.
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Develop.* **31**, 63-67.
- Prange-Kiel, J., Kreutzkamm, C., Wehrenberg, U., Rune, G. M. (2001). Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of swine. *Biol. Reprod.* **65**, 928–35.
- Silva, A. W. B., Bezerra, F. T. G., Glanzner, W. G., Santos, J. T., Dau, A. M. P., Rovani, M. T., Ilha, G. F., Costa, J. J. N., Cunha, E. V., Donato, M. A. M., Peixoto, C. A., Gonçalves, P. B. D., Bordignon, V., Silva, J. R. V. (2017a). mRNA expression profile of the TNF- α system in LH-induced bovine preovulatory follicles and effects of TNF- α on gene expression, ultrastructure and expansion of cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Theriogenology* **90**, 1-10.
- Silva, A. W. B., Ribeiro, R. P., Menezes, V. G., Barberino, R. S., Passos, J. R. S., Dau, A. M. P., Costa, J. J. N., Melo, L. R. F., Bezerra, F. T. G., Donato, M. A. M., Peixoto, C. A., Matos, M. H. T., Gonçalves, P. B. D., Van Den Hurk, R., Silva, J. R. V. (2017b). Expression of TNF α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* **182**, 56-68.
- Sowińska, N., Müller, K., Nizański, W., Jewgenow, K (2017). Mitochondrial characteristics in oocytes of the domestic cat (*Felis catus*) after in vitro maturation and vitrification. *Reprod. Domest. Anim.* **52**, 806-813.
- Spicer, L. J. (2001). Receptors for insulin-like growth factor-I and tumor necrosis factor- α are hormonally regulated in bovine granulosa and thecal cells. *Anim. Reprod. Sci.* **67**, 45–58.
- Sugiyama, M., Kawahara-Miki, R., Kawana, H., Shirasuna, K., Kuwayama, T., Iwata, H. (2015). Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. *J. Reprod. Dev.* **61**, 251-259.
- Sun, Q.Y., Wu, G.M., Lai, L., Park, K.W., Cabot, R., Cheong, H.T., Day, B.N., Prather, R.S., Schatten, H. (2001). Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* **122**, 155-163.
- Takahashi, Y., Hashimoto, S., Yamochi, T., Goto, H., Yamanaka, M., Amo, A., Matsumoto, H., Inoue, M., Ito, K., Nakaoka, Y., Suzuki, N., Morimoto, Y. (2016).

- Dynamic changes in mitochondrial distribution in human oocytes during meiotic maturation. *J. Assist. Reprod. Genet.* **33**, 929-938.
- Takehara, Y., Dharmarajan, A. M., Faufman, G., Wallach, E. E. (1994). Effect of interleukin-1b on ovulation in the in vitro perfused rabbit ovary. *Endocrinology*. **134**, 1788 - 1793.
- Tiwari, M., Chaube, S. K. (2017). Maturation promoting factor destabilization mediates human chorionic gonadotropin induced meiotic resumption in rat oocytes. *Develop. Growth Differ.* **59**. 603--614.
- Wasielak, M., Więsak, T., Bogacka, I., Jalali, B. M., Bogacki, M. (2017). Maternal effect gene expression in porcine metaphase II oocytes and embryos *in vitro*: effect of epidermal growth factor, interleukin-1 β and leukemia inhibitory factor. *Zygote*, **25**, 120-130.
- Yamochi, T., Hashimoto, S., Amo, A., Goto, H., Yamanaka, M., Inoue, M., Nakaoka, Y., Morimoto, Y. (2015). Mitochondrial dynamics and their intracellular traffic in porcine oocytes. *Zygote* **24**, 517-528.
- Yun, Y., An, P., Ning, J., Zhao, G. M., Yang, W. L., Lei, A. M. (2014). H1foo is essential for in vitro meiotic maturation of bovine oocytes. *Zygote* **23**, 416-425.
- Zhao, X., Singh, B., Batten, B. E. (1991). The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. *Oncogene* **1**, 43-49.
- Zolti, M., Bider, D., Seidman, D. S., Mashiach, S., Ben-Rafael, Z. (1992). Cytokine levels in follicular fluid of polycystic ovaries in patients treated with dexamethasone. *Fertil Steril* **57**, 501-504.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- O TNF- α sozinho e com IL-1 β promoveu o crescimento de oócitos *in vitro* durante um período de cultura de 48 h, mas esse crescimento não teve efeito positivo na maturação de oócitos de folículos antrais pequenos.
- Essas citocinas não influenciou a expressão de mRNAs para GDF-9, c-Mos, ciclina B1 e H1foo no oócito.
- O TNF- α teve, no entanto, um efeito na distribuição das mitocôndrias em oócitos pré-maturados.

8. PERSPECTIVAS

Esse trabalho contribuiu para aprofundar os conhecimentos sobre a suplementação do meio de maturação *in vitro* (MIV), visando o melhoramento de protocolos que utilizam oócitos oriundos de folículos antrais pequenos (1 – 3 mm). Além disso, esse estudo produziu informações relevantes que servirão de base para elaboração de novos projetos de pesquisa, os quais buscarão elucidar o papel dessas citocinas (IL-1 β e TNF- α), isoladamente ou em associação, com outras substâncias (hormônios, fatores de crescimento e outras citocinas), afim de potencializar os seus efeitos positivos durante o crescimento e pré-maturação de oócitos provenientes de folículos antrais pequenos. Doravante, novos protocolos aprimorados, capazes de maximizar a produtividade de rebanhos bovinos ou de outras espécies através da MIV poderão ser desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

- ADASHI, E. Y. The potential role of interleukin-1 in the ovulatory process: An evolving hypothesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 77-81, 1998.
- ALMEIDA, M. M.; CARVALHO, M. A. M.; CAVALCANTE FILHO, M. F.; MIGLINO, M. A.; MENEZES, D. J. A.. Estudo morfológico e morfométrico do ovário de cutias (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary**, v. 40, p. 55-62, 2003.
- ANUALPEC. **Anuário Brasileira da Pecuária 2014**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2014. 64 p.: il.
- APOSTOLOVA, Nadezda; VICTOR, Victor M. Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 8, p. 686-729, 2015.
- ARAÚJO, Carlos Henrique Medeiros; ARAÚJO, Maria Cristina Picinato Medeiros; MARTINS, Wellington de Paula; FERRIANI, Rui Alberto; REIS, Rosana Maria. Gametogênese: estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. **Medicina**, v. 40, n. 4, p. 551-558, 2007.
- AZARI-DOLATABAD, N.; RAHMANI, H.R.; HAJIAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; HOSSEINI, S.M.; NASR-ESFAHANI, M.H. Effects of cilostamide and/or forskolin on the meiotic resumption and development competence of growing ovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1483-1490, 2016.
- BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF- κ B: Ten years after. **Cell**, v. 87, p. 13-20, 1996.
- BAGAVANDOSS, P.; WIGGINS, R.C.; KUNKEL, S.L.; REMICK, D.G.; KEYES, P.L. Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 367-376, 1990.
- BAGG, M. A.; NOTTLE, M. B.; ARMSTRONG, D. T.; GRUPEN, C. G. Effect of follicle size and dibutyryl cAMP on the cAMP content and gap junctional communication of porcine prepubertal cumulus-oocyte complexes during IVM. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, p. 796-804, 2009.
- BELLI, M.; SHIMASAKI, S. Molecular Aspects and Clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function. **Vitamins and Hormones**, v. 107, p. 317-348, 2018.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before In Vitro Maturation and Its Value to In Vitro Embryo Production: Does it Improve Developmental Competence?. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 687-693, 2012.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Cows are not Mice; the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 8, p. 734-743, 2011.

BONIZZU, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 280-288, 2004.

BORASCHI, D.; TAGLIABUE, A. The interleukin-1 receptor family. **Seminars in Immunology**, v. 25, p. 394-407, 2013.

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

BOTIGELLI, Ramon Cesa; RAZZA, Eduardo Montanari; PIOLTINE, Elisa Mariano; NOGUEIRA, Marcelo Fábio Gouveia. New approaches regarding the *in vitro* maturation of oocytes: manipulating cyclic nucleotides and their partners in crime. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 21, n. 1, p. 35-44, 2017.

BOURGUIGNON, F.; MORRISSON, C. Inequality Among World Citizens: 1820-1992. **The American Economic Review**, v. 92, n. 4, p. 727-744, 2002.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n. 11, 2008.

BUI, T. M. T.; NGUYEN, K. X.; KARATA, A.; FERRÉ, P.; TRÂN, M. T.; WAKAI, T.; FUNAHASHI, H. Presence of vascular endothelial growth factor during the first half of IVM improves the meiotic and developmental competence of porcine oocytes from small follicles. **Reproduction, Fertility and Development**, 2016.

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, n. 26, p. 1-9, 2005.

CAMARA, Amadou K. S.; LESNEFSKY, Edward J.; STOWE, David F. Potential Therapeutic Benefits of Strategies Directed to Mitochondria. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n.3, p. 279-347, 2010.

CAMPOS, C. O.; VIREQUE, A. A.; CAMPOS, J. R.; SILVA, A. C. J. S. R. Influência da interação entre o ócito e as células da granulosa nos resultados dos procedimentos de reprodução assistida. **Feminina**. v. 39, n. 4, p. 207-216, 2011.

CASTILHO, C.; ASSIS, G.S.; GARCIA, J.M. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 288-294, 2007.

CASTRO, Anna; PETER, Marion; LORCA, Thierry; MANDART, Elisabeth. c-Mos and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation. **Biology of the Cell**, v. 93, p. 15-25, 2001.

CAYO-COLCA, I. S.; YAMAGAMI, Y.; PHAN, T. C.; MIYANO, T. A combination of FSH and dibutyryl cyclic AMP promote growth and acquisition of meiotic competence of oocytes from early porcine antral follicles. **Theriogenology**, v. 75, p. 1602-1612, 2011.

CHAUBE, S.K. Does cAMP act as regulator for oocyte meiotic resumption in mammal? **Journal of Cellular Physiology**, v. 24, p. 74-85, 2002.

CHAVES, R. M.; FILHO, C. A.; JÚNIOR, E. R. S.; FILHO, J. M. A.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. EFEITO DO DIÂMETRO FOLICULAR SOBRE A QUALIDADE DOS OÓCITOS OBTIDOS DE OVÁRIOS DE OVELHAS (*Ovis aries*) E CABRAS (*Capra hircus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 683-688, 2010a. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/6123/8624>>. Acesso em: 04 mar. 2017.

CHUN, S.Y.; HSUEH, A. J. W. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. **Reprod Immunol**, v. 39, p. 63-75, 1998.

COLLADO, Maite del; SARAIVA, Naiara Z.; LOPES, Flavia L.; GASPAR, Roberta C.; PADILHA, Luciana C.; COSTA, Roberta R.; ROSSI, Guilherme F.; VANTINI, Roberta; GARCIA, Joaquim M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.

CONTI, M.; ANDERSEN C.B.; RICHARD F.; MEHATS C.; CHUN S.Y.; HORNER, K. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 153–159, 2002.

COTTERILL, Matthew; HARRIS, Sarah E.; FERNANDEZ, Esther Collado; LU, Jianping; HUNTRISS, John D.; CAMPBELL, Bruce K.; PICTON, Helen M. The activity and copy number of mitochondrial DNA in ovine oocytes throughout oogenesis *in vivo* and during oocyte maturation in vitro. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 7, p. 444-450, 2013.

COURTOIS, Aurélien; SCHUH, Melina; ELLENBERG, Jan; HIIRAGI, Takashi. The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. **Journal of cell biology**, v. 198, n. 3, p. 357-370, 2012.

CRESPO, D.; MAÑANÓS, E.L.; ROHER, N.; MACKENZIE, S.A.; PLANAS, J.V. Tumor necrosis factor alpha may act as an intraovarian mediator of luteinizing hormone-induced oocyte maturation in trout. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1-12, 2012.

DALTON, Caroline M.; CARROLL, John. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. **Journal of Cell Science**. v. 126, p. 2955-2964, 2013.

De BEM, Tiago H.C.; CHIARATTI, Marcos R.; ROCHETTI, Raquel; BRESSAN, Fabiana F.; SANGALLI, Juliano R.; MIRANDA, Moysés S.; PIRES, Pedro R. L.; SCHWARTZ, Kátia R. L.; SAMPAIO, Rafael V.; FANTINATO-NETO, Paulo; PIMENTEL, José R. V.; PERECIN, Felipe; SMITH, Lawrence C.; MEIRELLES, Flávio V.; ADONA, Paulo R.; LEAL, Cláudia L. V. Viable calves produced by somatic cell nuclear transfer using meiotic-blocked oocytes. **Cellular Reprogramming**, v. 13, n. 5, p. 419-429, 2011.

DE SOUSA, P.A.; SILVA, S.J.M.; ANDERSON, R.A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: A paradigm for cellular totipotency. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 375-385, 2004.

DEKEL, N. Cellular Biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19-25, 2005.

DIECI, C.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LAGUTINA, I.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; ALBERTINI, D. F.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; Luciano, A. M. The effect of cilostamide on gap junction communication dynamics, chromatin remodeling, and competence acquisition in pig oocytes following parthenogenetic activation and nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 3, p. 1-15, 2013.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, p. 935-950, 2010.

DIÓGENES, Mateus Nunes; GUIMARÃES, Ana Luiza Silva; LEME, Ligiane Oliveira; FRANCO, Maurício Machaim; DODE, Margot Alves Nunes. Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 102, p. 190-198, 2017.

DUMONT, J.; UMBHAUER, M.; RASSINIER, P.; HANAUER, A.; VERLHAC, M.H. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. **Journal Cell Biology**, v. 169, p. 227-231, 2005.

EPPIG, J.J.; SCHULTZ, R.M.; O'BRIEN, M.; CHESNEL, F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 164, p. 1-9, 1994.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 437-442, 1995.

FARGHALY, T.; KHALIFA, E.; MOSTAFA, S.; HUSSEIN, M.; BEDAIWY, M.; AHMADY, A. The effect of temporary meiotic attenuation on the in vitro maturation outcome of bovine oocytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 51, n. 7, p. 662-671, 2015.

FAUSTMAN, Denise L.; DAVIS, Miriam. TNF receptor 2 and disease: autoimmunity and regenerative medicine. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 478, p. 1-8, 2013.

FERRÉ, P.; BUI, T. M. T.; WAKAI, T.; FUNAHASHI, H. Effect of removing cumulus cells from porcine cumulus-oocyte complexes derived from small and medium follicles during IVM on the apoptotic status and meiotic progression of the oocytes. **Theriogenology**, p.1-6, 2016.

FERREIRA, Ademir de Moraes; VIANA, João Henrique Moreira; CAMARGO, Luiz Sérgio de Almeida; De SÁ, Wanderlei Ferreira; PEREIRA, Pedro Augusto Carvalho. População Folicular Ovariana Durante o Ciclo Estral em Vacas da Raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1689-1694, 2004.

FERREIRA, Elisa Melo; VIREQUE, Alessandra Aparecida; ADONA, Paulo Roberto; FERRIANI, Rui Alberto; NAVARRO, Paula Andrea. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro

maturation. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 145, n. 1, p. 76-80, 2009.

FRIEDMAN, A.; WEISS, S.; LEVY, N.; MEIDAN, R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1905-1912, 2000.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews/Rheumatology**. v. 6, p. 232–241, 2010.

GAN, Ping; GAO, Zhenqiu; ZHAO, Xiuyun; QI, Gaofu. Surfactin inducing mitochondriadependent ROS to activate MAPKs, NF- κ B and inflammasomes in macrophages for adjuvant activity. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2016.

GARCIA, João Batista Santos; ISSY, Adriana Machado; SAKATA, Rioko Kimiko. Citocinas e Anestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 1, p. 86-100, 2002.

GHARIBI, Sh; HAJIAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; HOSSEINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; NASR-ESFAHANI, M. H. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on nuclear maturation and in vitro development of ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 302-312, 2013.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 61–79, 2000.

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.

GLEZER, Isaias; MARCOURAKIS, Tania; AVELLAR, Maria Christina Werneck; GORENSTEIN, Clarice; SCAVONE, Cristoforo. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 1, p. 26-30, 2000.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GOTTARDI F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n.2, p. 82-94, 2009.

GUEMRA, Samuel; da SILVA SANTO, Eriko; ZANIN, Renato; MONZANI, Paulo Sergio; SOVERNIGO, Tobias Canan; OHASHI, Otávio Mitio; VERDE LEAL, Cláudia Lima; ADONA, Paulo Roberto. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 982-987, 2014.

GUIGON, C. J.; MAGRE, S. Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 450-458, 2006.

GUMENI, Sentiljana; TROUGAKOS, Ioannis P. Cross Talk of Proteostasis and Mitostasis in Cellular Homeodynamics, Ageing, and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-24, 2016.

GUZMAN, L.; ADRIAENSSENS, T.; ORTEGA-HREPICH, C.; ALBUZ, F. K.; MATEIZEL, I.; DEVROEY, P.; VOS, M. De; SMITZ, J. Human antral follicles <6 mm: a comparison between *in vivo* maturation and *in vitro* maturation in non-hCG primed cycles using cumulus cell gene expression. **Molecular Human Reproduction**, v.19, n.1 p. 7-16, 2013.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 8, p. 576-596, 1995.

HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar. Signaling to NF- κ B. **Genes & Development**, v. 18, n. 18, p. 2195-2224, 2004.

HREINSSON, Julius Gisli; SCOTT, Jennifer E.; RASMUSSEN, Carsten; SWAHN, Marja Liisa; HSUEH, Aaron J. W.; HOVATTA, Outi. Growth Differentiation Factor-9 Promotes the Growth, development, and Survival of Human Ovarian Follicles in Organ Culture. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 1, p. 316-321, 2002.

HSU, H.; XIONG, J.; GOEDEL, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. **Cell**, v. 81, p. 495-504, 1995.

HUANG, Weiping; KANG, Sung-Sik; NAGAI, Katsuhisa; YANAGAWA, Yojiro; TAKAHASHI, Yoshiyuki; NAGANO, Masashi. Mitochondrial activity during pre-maturational culture in *in vitro*-grown bovine oocytes is related to maturational and developmental competences. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 3, p. 349-356, 2016.

HUANG, Weiping; NAGANO, Masashi; KANG, Sung-Sik; YANAGAWA, Yojiro; TAKAHASHI, Yoshiyuki. Effects of *in vitro* growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, 793-799, 2013.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

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.

IWATA, H.; GOTO, H.; TANAKA, H.; SAKAGUCHI, Y.; KIMURA, K.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. **Reprod Fertil Dev**. v. 23, n.3, 424-432, 2011.

JACKOWSKA, M.; KEMPISTY, B.; WOŻNA, M.; PIOTROWSKA, H.; ANTOSIK, P.; ZAWIERUCHA, P.; BUKOWSKA, D.; NOWICKI, M.; JAŚKOWSKI, J. M.; BRÜSSOW, K. P. Differential expression of GDF9, TGFB1, TGFB2 and TGFB3 in porcine oocytes isolated from

follicles of different size before and after culture *in vitro*. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 61, n. 1, p. 99-115, 2013.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Annual review of immunology**, v. 18, p. 621-663, 2000.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; ALM, H.; TORNER, H.; HELEIL, B.; TUCHSCHERER, A.; RYNSKA, B. Mitochondrial aggregation patterns and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 75, p. 662-670, 2011.

KEMPISTY, B.; PIOTROWSKA, H.; RYBSKA, M.; WOZNA, M.; ANTOSIK, P.; BUKOWSKA, D.; ZAWIERUCHA, P.; CIESIÓŁKA, S.; JASKOWSKI, J. M.; NOWICKI, M.; BRÜSSOW, K. P.; ZABEL, M. Expression of INH β A and INH β B proteins in porcine oocytes cultured *in vitro* is dependent on the follicle size. **Zygote**, v. 23, n. 2, p. 205-211, 2015.

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.

KOHEK, Maria Beatriz da Fonte; LATRONICO, Ana Claudia. O Papel dos Receptores das Gonadotrofinas na Reprodução Feminina. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 45, n. 4, p. 369-374, 2001.

KONA, S.S.; PRAVEEN CHAKRAVARTHI, V.; SIVA KUMAR, A.V.; Srividya, D.; PADMAJA, K.; RAO, V.H. Quantitative expression patterns of GDF9 and BMP15 genes in sheep ovarian follicles grown *in vivo* or cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 85, n. 2, p. 315-322, 2016.

KOOL, M.; FIERENS, K.; LAMBRECHT, B. N. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 927-934, 2012.

KRAYCHETE, Durval Campos; CALASANS, Maria Thais de Andrade; VALENTE, Camila Motta Leal. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev Bras Reumatol**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; Pavlok, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 292-302, 2000.

KWAK, S. S.; YOON, J. D.; CHEONG, S. A.; JEON, Y.; LEE, E.; HYUN, S. H. The new system of shorter porcine oocyte *in vitro* maturation (18 hours) using \approx 8 mm follicles derived from cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 81, p. 291-301, 2014.

LABRECQUE, R.; FOURNIER, E.; SIRARD, M. A. Transcriptome Analysis of Bovine Oocytes From Distinct Follicle Sizes: Insights From Correlation Network Analysis. **Molecular Reproduction & Development**, v. 83, p. 558-569, 2016.

LATRONICO, Ana Claudia; SEGALOFF, Deborah L. Naturally Occurring Mutations of the Luteinizing-Hormone Receptor: Lessons Learned about Reproductive Physiology and G Protein-Coupled Receptors. **American Journal of Human Genetics**, v. 65, p. 949-958, 1999.

LECHNIAK, D; KACZMAREK, D; STANISLAWSKI, D; ADAMOWICZ, T. The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. **Theriogenology**, v. 57, p. 1303-1308, 2002.

LEE, H.; ELAHI, F.; LEE, J.; LEE, S. T.; HYUN, S. H.; LEE, E. Supplement of cilostamide in growth medium improves oocyte maturation and developmental competence of embryos derived from small antral follicles in pigs. **Theriogenology**, 91, 1-8, 2017.

LEITÃO, Cintia Camurça Fernandes; BRITO, Ivina Rocha; FROTA, Isana Mara Aragão; SILVA, José Roberto Viana. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n. 3, p. 215-224, 2009.

LI, H.J.; SUTTON-McDOWALL, M.L.; WANG, X.; SUGIMURA, S.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Extending prematuration with cAMP modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via gap junctions. **Human Reproduction**, v. 31, n. 4, p. 810-821, 2016.

LIMA, G. L.; SANTOS, É. A. A. Aplicação das biotécnicas de MOIFOPA, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, p. S36-S42, 2010.

LIU, Shan; LI, Yuan; GAO, Xuan; YAN, Jun-Hao; CHEN, Zi-Jiang. Changes in the distribution of mitochondria before and after *in vitro* maturation of human oocytes and the effect of *in vitro* maturation on mitochondria distribution. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 5, p. 1550-1555, 2010.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine Oocyte and Embryo Development Following Meiotic Inhibition With Butyrolactone I. **Molecular reproduction and Development**, v. 57, p. 204-209, 2000.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v.85, p. 1252-1259, 2011.

MA, C. H.; YAN, L. Y.; QIÃO, J.; SHA, W.; LI, L.; CHEN, Y.; SUN, Q. Y. Effects of tumor necrosis factor-alpha on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. **Fertil Steril**, v. 93, p. 920-926, 2010.

MACHELON, V.; EMILIE, D. Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary. **European CytokineNetwork**, v. 8, n. 2, p. 137-143, 1997.

MAPELLI, M.; MASSIMILIANO, L.; ROVACE, C.; SEELIGER, M.A.; TSAI, L-H.; MEIJER, L.; MUSACCHIO, A. Mechanism of CDK5/p25 Binding by CDK Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 671-679, 2005.

MARCINKIEWICZ, J.L.; KRISHNA, A.; CHEUNG, C.M.; TERRANOVA, P.F. Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal rat ovary and throughout follicular development in the adult rat. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 1251-1260, 1994.

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_α via specific IL-1 receptors. **Reproduction**, v. 126, p. 509-515, 2003.

MATTERN, F.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; HAAF, T.; NIEMANN, H. Gene-specific profiling of DNA methylation and mRNA expression in bovine oocytes derived from follicles of different size categories. **Reproduction, Fertility and Development**, p. A-L, 2017.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p.180-184, 2002.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v.21, n. 2, p. 200-214, 2000.

McGRAW, S; VIGNEAULT, C; TREMBLAY, K; SIRARD, M.A. Characterization of Linker Histone H1FOO During Bovine *In vitro* Embryo Development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 692-699, 2006.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 183-188, 2001.

MICHEAU, Olivier; TSCHOPP, Jurg. Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes, **Cell**, v. 114, n. 2, p. 181–190, 2003.

MOTLIK, J.; FULKA, J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. **Theriogenology**, v. 25, p. 87-96, 1986.

MUZIO, Marta; NI, Jian; FENG, Ping; DIXIT, Vishva M. IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling. **Science**, v. 278, p. 1612-1615, 1997.

NASCIMENTO, Aparecida Alves; PINHEIRO, Nadja Lima; SALES, Armando; VIANA, João Henrique Moreira. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 126-132, 2003.

NAZ, R.K.; ZHU, X.; MENGE, A.C. Expression of tumor necrosis factor-α and its receptors type I and type II in human oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 127-133, 1997.

NAZMARA, Zohreh; SALEHNIA, Mojdeh; HOSSEIN-KHANI, Saman. Mitochondrial Distribution and ATP Content of Vitrified, In vitro Matured Mouse Oocytes. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 210-217, 2014.

NEGREDA, A. R.; PORRAS, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 6, p. 257-260, 2000.

NEWMAN, L. E.; ZHOU, C. J.; MUDIGONDA, S.; MATTHEYSES, A. L.; PARADIES, E.; MAROBIO, C. M.; KAHN, R. A. The ARL2 GTPase is required for mitochondrial morphology, motility, and maintenance of ATP levels. **PLOS one**, v. 9, n. 6, p. 1-15, 2014.

NILSSON, E.E.; STANFIELD, J. SKINNER, M.K. Interactions between progesterone and tumor necrosis factor- α in the regulation of primordial follicle assembly. **Reproduction**, v. 132, p. 877–886, 2006.

NISHIKORI, Momoko. Classical and alternative NF- κ B activation pathways and their roles in lymphoid malignancies. **Journal of clinical and experimental hematopathology**, v. 45, n. 1, p. 15-24, 2005.

O'DOHERTY, A. M.; O'SHEA, L. C.; FAIR, T. Bovine DNA Methylation Imprints Are Established in an Oocyte Size-Specific Manner, Which Are Coordinated with the Expression of the DNMT3 Family Proteins. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 1–10, 2012.

OBERLENDER, G.; MURGAS, L. D. S.; ZANGERONIMO, M. G.; SILVA, A. C.; MENEZES, T. A.; PONTELO, T. P.; VIEIRA, L. A. Role of insulin-like growth factor-I and follicular fluid from ovarian follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, p. 1-9, 2013.

OKUDAIRA, Y.; WAKAI, T.; FUNAHASHI, H. Levels of cyclic-AMP and cyclic-GMP in porcine oocyte-cumulus complexes and cumulus-free oocytes derived from small and middle follicles during the first 24-hour period of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Development**, 2017.

OLIVEIRA, Caio Marcio Barros; SAKATA, Rioko Kimiko; ISSY, Adriana Machado; GEROLA, Luis Roberto; SALOMÃO, Reynaldo. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

PASSOS J.R.S.; COSTA, J.J.N.; CUNHA, E.V. da; SILVA, A.W.B.; RIBEIRO, R.P.; SOUZA, G.B. de; BARROSO, P.A.A.; DAU, A.M.P.; SARAIVA, M.V.A.; GONÇALVES, P.B.D.; HURK, R. van den; SILVA, J.R.V. Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1b on primordial follicle activation and survival *in vitro*. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 54, p. 48-59, 2016.

PAULINO, L. R. F. M; CUNHA, E. V; SILVA, A. B; SOUZA, G; DONATO, M; PEIXOTO, C; MATOS, B.B; VAN DEN HURK, R; LOPES, E.P; SILVA, J. R. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) on in-vitro development of bovine secondary follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, 2017.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p. 63-67, 1992.

PELUFFO, M. C.; HENNEBOLD, J. D.; STOUFFER, R. L.; ZELINSKI, M. B. Oocyte maturation and *in vitro* hormone production in small antral follicles (SAFs) isolated from rhesus monkeys. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 353-359, 2013.

PELUFFO, M. C.; TING, A. Y.; ZAMAH, A. M.; CONTI, M.; STOUFFER, R. L.; ZELINSKI, M. B.; HENNEBOLD, J. D. Amphiregulin promotes the maturation of oocytes isolated from the small antral follicles of the rhesus macaque. **Human Reproduction**, v. 27, n. 8, p. 2430–2437, 2012.

PICARD, Martin; SHIRIHAI, Orian S.; GENTIL, Benoit J.; BURELLE, Yan. Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?. **American Journal of Physiology**, v. 304 n. 6, p. R393-R406, 2013.

PICTON, H. M.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol Cell Endocrinol**, v. 145, p. 27-37, 1998.

PONTES J.H.F.; NONATO-JUNIOR I.; SANCHEZ B.V; ERENO-JUNIOR J.C.; UVO S.; BARREIROS T.R.R.; OLIVEIRA J.A.; HASLER J.F.; SENEDA M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690-697, 2009.

PRANGE-KIEL, J.; KREUTZKAMM, C.; WEHRENBURG, U. RENE, G.M. Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of swine. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 928-935, 2001.

RAUERT, Hilka; WICOVSKY, Andreas; MULLER, Nicole; SIEGMUND, Daniela; SPINDLER, Volker; WASCHKE, Jens; KNEITZ, Christian; WAJANT, Harald. Membrane Tumor Necrosis Factor (TNF) Induces p100 Processing via TNF Receptor-2 (TNFR2). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7394-7404, 2010.

REIMOLD, A.M. New indications for treatment of chronic inflammation by TNF-alpha blockade. **The American of the Journal Medical Sciences.**, v. 325, p. 75-92, 2003.

RICE, V.M.; WILLIAMS, V.R.; LIMBACK, S.D.; TERRANOVA, P.F. Tumor necrosis factor- α inhibits follicle stimulating hormone induced-granulosa cell oestradiol secretion in the human: dependence on size of follicles. **Human Reproduction**, v. 11, p. 1256-61, 1996.

RIMON-DAHARI, Nitzan; YERUSHALMI-HEINEMANN, Lia; ALYAGOR, Liat; DEKEL, Nava. Ovarian Folliculogenesis. R.P. Piprek (ed.), Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development, **Cell Differentiation**, p. 167-190, 2016.

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

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: Hirshfield AN (ed.), **Growth Factors and the Ovary**. New York: Plenum Publishing Corporation, p. 273-278, 1989.

ROBY, K.F.; WEED, J.; LYLES, R.; TERRANOVA, P.F. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 71, p. 1096-1102, 1990b.

ROMAGUERA, R.; MORATÓ, R.; JIMÉNEZ-MACEDO, A.R.; CATALÁ, M.; ROURA, M.; PARAMIO, M.T.; PALOMO, M.J.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Oocyte secreted factors improve embryo developmental competence of COCs from small follicles in prepubertal goats. **Theriogenology**, 74, p. 1050–1059, 2010.

ROMERO, Sergio; SÁNCHEZ, Flor; LOLICATO, Francesca; VAN RANST, Heidi; SMITZ, Johan. Immature Oocytes from Unprimed Juvenile Mice Become a Valuable Source for Embryo Production When Using C-Type Natriuretic Peptide as Essential Component of Culture Medium. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 3, 2016.

ROTHER, M.; SARMA, V.; DIXIT, V. M.; GOEDDEL, D. V. TRAF2-mediated activation of NF-kappaB by TNF receptor 2 and CD40. **Science**, v. 269, p. 1424-1427, 1995.

SAKUMOTO, R.; OKUDA, K. Possible actions of tumor necrosis factor- α in ovarian function. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 39-46, 2004.

SÁNCHEZ, F.; LOLICATO, F.; ROMERO, S.; DE VOS, M.; VAN RANST, H.; VERHEYEN, G.; ANCKAERT, E.; SMITZ, J. E. J. An improved IVM method for cumulus-oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield. **Human Reproduction**, v. 32, n. 10, p. 2056-2068, 2017.

SANCHO-TELLO, M.; TASH, J.; ROBY, K.; TERRANOVA, P.F. Effects of lipopolysaccharide on ovarian function in the pregnant mare serum gonadotropin- treated immature rat. **Endocrine Journal**, v. 1, p. 503-511, 1993.

SANTOS, T. C.; MIGLINO, M. A.; MACHADO, G. V.; SOUZA, W. M. Morologia dos ovários, tbas uterinas e útero em catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) e queixadas (*Taya ssu pecari*, Link, 1795). Braz. J. Res. Anim. Sci. v. 37, n. 3, p. 203-209, 2000.

SATO, Eimei. Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals. Proceedings of the Japan Academy, Series B **Physical and Biological Sciences**, v. 91, n. 3, p. 76-91, 2015.

SCHANG, L. M.; Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1697, p. 197-209, 2004.

SCHWENEKER, K.; GORKA, O.; SCHWENEKER, M.; POECK, H.; TSCHOPP, J.; PESCHEL, C.; RULAND, J.; GROß, O. The mycobacterial cord factor adjuvant analogue trehalose-6,6'-dibehenate (TDB) activates the Nlrp3 inflammasome. **Immunobiology**, v. 218, n. 4, p. 664-73, 2013.

SENFLEBEN, Uwe; CAO, Yixue; XIAO, Gutian; GRETEN, Florian R.; KRÄHN, Gertraud; BONIZZI, Giuseppina; CHEN, Yi; HU, Yinling; FONG, Abraham; SUN, Shao-Cong; KARIN, Michael. Activation by IKK α of a Second, Evolutionary Conserved, NF- κ B Signaling Pathway. **Science**, v. 293, p. 1995-1999, 2001.

SHENG, J.; YANG, Y.; LIU, W.; JI, H.; LEI, A.; QING, S. Location of oocyte-specific linker histone in pig ovaries at different developmental stages postpartum. **Theriogenology**, v. 83, n. 7, p. 1203-1212, 2015.

SILVA, A.W.B.; BEZERRA, F.T.G.; GLANZNER, W.G.; SANTOS, J.T.; DAU, A.M.P.; ROVANI, M.T.; ILHA, G.F.; COSTA, J.J.N.; CUNHA, E.V.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; GONÇALVES, P.B.D.; BORDIGNON, V.; SILVA, J.R.V. mRNA expression profile of the TNF- α system in LH-induced bovine preovulatory follicles and effects of TNF- α on gene expression, ultrastructure and expansion of cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 90, p. 1-10, 2017a.

SILVA, A.W.B.; RIBEIRO, R.P.; MENEZES, V.G.; BARBERINO, R.S.; PASSOS, J.R.S.; DAU, A.M.P.; COSTA, J.J.N.; MELO, L.R.F.; BEZERRA, F.T.G.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; MATOS, M.H.T.; GONÇALVES, P.B.D.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, p. 1-13, 2017b.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, p. 483-497, 1998.

SOLT, Laura A.; MADGE, Lisa A.; ORANGE, Jordan S.; MAY, Michael J. Interleukin-1-induced NF- κ B Activation Is NEMO-dependent but Does Not Require IKK β . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8724-8733, 2007.

SOUZA, M. I. L.; VELÁSQUEZ, L. F. U. O Fator de Necrose Tumoral - α (TNF- α) na Reprodução de Fêmeas – Revisão de Literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 11, n. 1, p. 47-53, 2008.

SPICER, L. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) inhibits steroidogenesis of bovine ovarian granulosa and thecal cells *in vitro*. Involvement of TNF- α receptors. **Endocrine**, v. 8, p. 109-115, 1998.

SPICER, L.J. Receptors for insulin-like growth factor-I and tumor necrosis factor- α are hormonally regulated in bovine granulosa and thecal cells. **Animal Reproduction Science**, p. 45-67, 2001.

SUGIYAMA, Miyako; KAWAHARA-MIKI, Ryoka; KAWANA, Hirosuke; SHIRASUNA, Koumei; KUWAYAMA, Takehito; IWATA, Hisataka. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61 n. 4, p. 251-259, 2015.

SUI, Xinbing; KONG, Na; YE, Li; HAN, Weidong; Jichun ZHOU,; ZHANG, Qin; Chao HE,; PAN, Hongming. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. **Cancer Letters**, v. 344, n. 2, p. 174-179, 2014.

SUN, Shao-Cong; LEY, Steven C. New insights into NF- κ B regulation and function. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 10, p. 469-478, 2008.

TAKAHASHI, Yuki; HASHIMOTO, Shu; YAMOCHI, Takayuki; GOTO, Hiroya; YAMANAKA, Masaya; AMO, Ami; MATSUMOTO, Hiroshi; INOUE, Masayasu; ITO, Keijiro; NAKAOKA, Yoshiharu; SUZUKI, Nao; MORIMOTO, Yoshiharu. Dynamic changes in mitochondrial distribution in human oocytes during meiotic maturation. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 33, n. 7, p. 929-38, 2016.

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.

TAKEO, Shun; GOTO, Hiroya; KUWAYAMA, Takehito; MONJI, Yasunori; IWATA, Hisataka. Effect of Maternal Age on the Ratio of Cleavage and Mitochondrial DNA Copy Number in Early Developmental Stage Bovine Embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 2, 2013.

TAN, Dun-Xian; MANCHESTER, Lucien C.; QIN, Lilan; REITER, Russel J. Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n.12, 2016.

TOPFER, D.; EBELING, S.; WEITZEL, J. M.; SPANNBRUCKER, A. C. Effect of Follicle Size on *In vitro* Maturation of Pre-Pubertal Porcine Cumulus Oocyte Complexes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, p. 370-377, 2016.

TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, n. 26, p.1-9, 2006.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, p. 592-600, 2010.

URREGO, R.; HERRERA-PUERTA, E.; CHAVARRIA, N.A.; CAMARGO, O.; WRENZYCKI, C.; RODRIGUEZ-OSORIO, N. Follicular progesterone concentrations and messenger RNA expression of MATER and OCT-4 in immature bovine oocytes as predictors of developmental competence. **Theriogenology**, v. 83, n. 7, p. 1179-1187, 2015.

VAN DEN HURK, R.; & ZHAO, J. Formation of ovarian follicles and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VELDHUIS, J.D.; GARMEY, J.C.; URBAN, R.J.; DEMERS, L.M.; AGGARWAL, B.B. Ovarian actions of Tumor necrosis factor- α (TNF α): pleiotropic effects of TNF α on differentiated functions of untransformed swine granulosa cells. **Endocrinology**, v. 129, p. 641-648, 1991.

WANG, Chong; DU, Wanqing; SU, Qian Peter; ZHU, Mingli; FENG, Peiyuan; LI, Ying; ZHOU, Yichen; MI, Na; ZHU, Yueyao; JIANG, Dong; ZHANG, Senyan; ZHANG, Zerui; SUN, Yujie; YU, Li. Dynamic tubulation of mitochondria drives mitochondrial network formation. **Cell Research**, v. 25, p. 1108-1120, 2015.

WANG, W.; DAY, B.N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes?. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 335-341, 2003.

WASIELAK, M.; WIĘSAK, T.; BOGACKA, I.; JALALI, B.M.; BOGACKI, M. Maternal effect gene expression in porcine metaphase II oocytes and embryos *in vitro*: effect of epidermal growth factor, interleukin-1 β and leukemia inhibitory factor. **Zygote**, v. 25, n. 2, p.120-130, 2017.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) Processing Pathway. **Science Signaling**, v. 3, n. 105, 2010.

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.

WESTRATE, Laura M.; DROCCO, Jeffrey A.; MARTIN, Katie R.; HLAVACEK, William S.; MacKEIGAN, Jeffrey P. Mitochondrial Morphological Features Are Associated with Fission and Fusion Events. **PLOS One**, v. 9, n. 4, p. 1-15, 2014.

WU, Hao; ARRON, Joseph R. TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology. **Bioessays**, v. 25, n. 11, p. 1096-1105, 2003.

WULLAERT, Andy; van LOO, Geert; HEYNINCK, Karen; BEYAERT, Rudi. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. **Endocrine reviews**, v. 28, n. 4, p. 365-386, 2007.

XIAO, B.; FREEDMAN, B. S.; MILLER, K. E.; HEALD, R.; MARKO, J. F. Histone H1 compacts DNA under force and during chromatin assembly. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 24, p. 4864-4871, 2012.

YAMAMOTO, Yuri; KUWAHARA, Akira; TANIGUCHI, Yuka; YAMASAKI, Mikio; TANAKA, Yu; MUKAI, Yukari; YAMASHITA, Mizuho; MATSUZAKI, Toshiya; YASUI, Toshiyuki; IRAHARA, Minoru. Tumor necrosis factor alpha inhibits ovulation and induces granulosa cell death in rat ovaries. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 14, n. 3, p. 107-115, 2015.

YAMOCHI, T.; HASHIMOTO, S.; AMO, A.; GOTO, H.; YAMANAKA, M.; INOUE, M.; NAKAOKA, Y.; MORIMOTO, Y. Mitochondrial dynamics and their intracellular traffic in porcine oocytes. **Zygote**, v. 24, p. 517-528, 2015.

YANG, M.; HALL, J.; FAN, Z.; REGOUSKI, M.; MENG, Q.; RUTIGLIANO, H. M.; STOTT, R.; ROOD, K. A.; PANTER, K. E.; POLEJAEVA, I. A. Oocytes from small and large follicles exhibit similar development competence following goat cloning despite their differences in meiotic and cytoplasmic maturation. **Theriogenology**, 2016.

ZENG, Hai-Tao; RICHANI, Dulama; SUTTON-McDOWALL, Melanie L.; REN, Zi; SMITZ, Johan; STOKES, Yvonne; GILCHRIST, Robert B.; THOMPSON, Jeremy G. Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 2, 2014.

ZHANG, J. M.; NA, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**. v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHAO, X.; SINGH, B.; BATTEN, B.E. The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. **Oncogene**, v. 1, p. 43-49, 1991.

ZHOU, C. X.; SHI, L. Y.; LI, R. C.; LIU, Y. H.; XU, B. Q.; LIU, J. W.; YUAN, B.; YANG, Z. X.; YING, X. Y.; ZHANG, D. GTPase-activating protein Elmod2 is essential for meiotic progression in mouse oocytes. **Cell Cycle**, v. 16, n. 9, p. 852-860, 2017.

ZHOU, Yuan-Yuan; LI, Ying; JIANG, Wei-Qin; ZHOU, Lin-Fu. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 3, p. 1-10, 2015.

ZOROV, Dmitry B.; JUHASZOVA, Magdalena; SOLLOTT, Steven J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 909-950, 2014.