



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

LAÍS RAIANE FEITOSA MELO PAULINO

**EFEITO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α) E DA
INTERLEUCINA-1 BETA (IL-1 β) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO***

SOBRAL – CEARÁ

2017

LAÍS RAIANE FEITOSA MELO PAULINO

**EFEITO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF- α) E DA
INTERLEUCINA-1 BETA (IL-1 β) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO***

Aprovada em: 07/03/2017.

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA

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

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

Prof. Dr. Fabrício Sousa Martins
(Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA)

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)

P353e Paulino, Lais Raiane Feitosa Melo.
Efeito do fator de necrose tumoral alpha (TNF-alpha) e da interleucina -1 beta (IL-1beta) sobre o desenvolvimento de folículos secundários bovinos cultivados in vitro : Efeito do fator de necrose tumoral alpha (TNF-alpha) e da interleucina -1 beta (IL-1beta) sobre o desenvolvimento de folículos secundários bovinos cultivados in vitro / Lais Raiane Feitosa Melo Paulino. – 2017.
80 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, , Sobral, 2017.
Orientação: Profa. Dra. José Roberto Viana Silva.
Coorientação: Profa. Dra. José Roberto Viana Silva.

1. ovário. 2. folículo pré-antral. 3. bovino. I. Título.

CDD

*Ao meu Senhor misericordioso que nunca
me desamparou.*

*Aos meus pais, Maria das Graças e
Altevir (em memória) por infinito amor,
às minhas irmãs Lara e Lívia, por todo
carinho, ao meu marido Vinícius, anjo
que Deus colocou na minha vida e aos
meus amigos pela amizade e apoio.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Sou grata primeiramente ao meu supremo Deus, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, por me ensinar em todos eles a dar o devido valor a dádiva que é a vida dada por ele, sem ele nada seria possível de ser realizado.

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

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

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pelo exemplo de profissional competente, por nunca desamparar sua equipe, agradeço pelo acolhimento e por ter depositado em mim toda confiança.

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

A professora Dr. Mariana Donato pela colaboração, amizade e acolhida no Centro de pesquisas Aggeu Magalhães FIOCRUZ - Universidade Federal de Pernambuco. Feliz por ter conhecido você!

Aos meus pais, Maria das Graças e Altevir, por serem meu alicerce e terem feito de mim a pessoa que sou hoje. Por todo amor e dedicação, meu pai que mesmo não estando mais entre nós se faz presente em cada degrau que eu suba. Minha mãe por ser o que eu tenho de mais precioso. Amo vocês eternamente!

As minhas irmãs, Lara e Lívia por sempre terem orgulho de mim, confiaram e acreditaram em meu trabalho. Em especial, minha sobrinha Isis que chegou para encher minha vida de mais amor e ternura.

Ao meu esposo Vinícius, por ser exemplo de companheirismo e cumplicidade, por me oferecer todo seu amor e dedicação. Meu amor, tudo fica mais fácil com você do meu lado. Te amo!

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas, especialmente à minha tia Olinda, por me incentivar a sempre tentar ser melhor profissionalmente. Obrigada pela força!

Agradeço também a minha Sogra Anúsia, Sogro Vanderlei e meu cunhado Wanderley Filho, por me aceitarem na família e me mostrar o verdadeiro valor da união, agradeço também pelo incentivo e apoio. Obrigado pelo carinho!

Aos meus amigos Yve Batista e Pedro Alves que são os melhores amigos que alguém pode ter, muito obrigada pela amizade, dedicação, ensinamentos e auxílio. Encontrei na amizade de vocês a forma mais sincera de carinho.

Aos meus colegas e amigos Anderson Weiny e Ellen Vasconcelos que foram peça chave para que esse trabalho fosse realizado, vocês foram os melhores colaboradores que alguém pode ter. Obrigada por toda dedicação e amizade!

A toda equipe do grupo de pesquisa em Biotecnologia da Reprodução e Cultura de Células e Tecidos (UFC), Glaucinete Borges, Bianca Silva, Edilcarlos Marques, Bruno Matos, Carlos Henrique Melo, Taiã Gomes, Adriel Castro, Miguel Fernandes e Laryssa Barroso. Em especial Everton Pimentel, que colaborou de forma significativa em todos os experimentos. Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementando e nos fortalecendo.

Aos que contribuíram de forma significativa no grupo de pesquisa de Biotecnologia da Reprodução e Cultura de Células e Tecidos (UFC), e que hoje trilham seus caminhos: Renato Passos, Gisvani Lopes, Regislane Ribeiro, pelo companheirismo em todos os momentos vividos, ensinamentos repassados e dúvidas tiradas.

Aos meus amigos de perto e de longe, aos antigos e mais recentes, aqueles a quem vejo todos os dias e aqueles que raramente encontro, que sempre torceu por mim, e acreditava que tudo daria certo. Meus sinceros agradecimentos!

Aos colegas de mestrado, Rayane Sousa, Nayara Cazario, Rondinely Silva, Elaine Furtado, Marcos Eber Rogerio, Denise Nogueira, Rosilane Sousa, pelos momentos vividos e laços de amizade firmados durante o período do curso.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, em especial ao Sr. Almino Conrado, Edilda Ponte, Gade Sousa e Maria José, pelos muitos auxílios prestados a mim.

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

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

Entregue o seu caminho ao Senhor;
confie nele e ele agirá.

Salmos 37:5

RESUMO

O crescimento folicular ovariano é regulado por diversas substâncias, tais como hormônios, fatores de crescimento e citocinas. O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β) são citocinas pró-inflamatórias que apresentam vários locais de síntese no ovário. Nesse contexto, o estudo do efeito destas citocinas durante o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais é de grande importância para a compreensão dos mecanismos que controlam o desenvolvimento folicular *in vitro*. O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito do TNF- α e IL-1 β sobre o desenvolvimento e a sobrevivência de folículos secundários bovinos após 18 dias de cultivo *in vitro*. Folículos secundários (~ 0,2 mm) foram isolados do córtex ovariano de vacas e cultivados individualmente. Os folículos secundários foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: (I) TCM-199⁺ sozinho (controle) ou suplementado com (II) IL-1 β (10 ng/mL), (III) TNF- α (10 ng/mL) e (IV) e ambos TNF- α e IL-1 β . Os folículos foram cultivados a 38,5 °C, com 5% de CO₂, durante 18 dias. A cada dois dias, 60 μ L de meio de cultivo foram substituídos por meio fresco. Em seguida, avaliou-se o efeito destes tratamentos sobre crescimento, sobrevivência folicular, formação do antro, viabilidade, ultraestrutura e níveis de RNAm para GDF9, C-MOS, H1foo e Ciclina B1. No final de 18 dias de cultivo *in vitro*, o diâmetro folicular e taxa de formação de antro aumentaram após o cultivo em meio suplementado com apenas TNF- α . Todos os tratamentos mantiveram viabilidade após o cultivo entre 74.32 e 92.00%. A análise da ultraestrutura mostrou que os folículos cultivados na presença do TNF- α e IL-1 β mantiveram a ultraestrutura do citoplasma do oócito e das células da granulosa. Os folículos cultivados expressaram RNAm para GDF9, C-MOS, H1foo e Ciclina B1, mas não houve diferença significativa entre os tratamentos. Em conclusão, o TNF- α contribui para o crescimento folicular e a manutenção da ultra-estrutura de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro*.

Palavras chaves: ovário; folículo pré-antral; bovino;

ABSTRACT

Ovarian follicular growth is regulated by various substances, such as hormones, growth factors and cytokines. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) are proinflammatory cytokines that have several sites of synthesis in the ovary. In this context, the study of the effect of these cytokines during the *in vitro* growth of preantral follicles is of great importance for understanding the mechanisms that control follicular development *in vitro*. The objective of the present study was to determine the effect of TNF- α and IL-1 β on development and survival of bovine secondary follicles after 18 days of culture *in vitro*. Secondary follicles (~0.2mm) were isolated from ovarian cortex of cows and individually cultured. The secondary follicles were randomly distributed in the following treatments: (I) TCM-199⁺ alone (culture control), or supplemented with (II) 10 ng/mL IL-1 β , (III) 10 ng/mL TNF- α and (IV) both TNF- α and IL-1 β . The follicles were cultured at 38.5°C, with 5% CO₂ in air, for 18 days. Thereafter, the effect of these treatments on growth, follicular survival, antrum formation, viability, ultrastructure and mRNA levels for GDF9, C-MOS, H1foo and Cyclin B1 were then evaluated. At the end of 18 days of *in vitro* culture, TNF- α increased follicular diameter and the rate of antrum formation. On the other hand, IL-1 β and both IL-1 β and TNF- α did not influence follicle growth. All treatments maintained viability rates after culture between 74.32 and 92.00%. Ultrastructural analysis of showed that follicles cultured in the presence of TNF- α had oocyte cytoplasm and granulosa cells well preserved. The presence of TNF- α , IL-1 β or both did not influence the expression o mRNAs for GDF9, C-MOS, H1foo and Cyclin B1 after 18 days of culture. In conclusion, TNF- α promotes follicular growth and maintains the ultrastructure of isolated bovine secondary follicles cultured *in vitro*.

Key words: ovary; Pre-antral follicle; bovine;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.	Desenho esquemático do ovário de mamíferos representando os folículos ovarianos, corpos lúteos e albicans na região cortical e vasos na região medular.	22
FIGURA 2.	Representação esquemática da classificação de folículos pré antrais ao longo da foliculogênese	25
FIGURA 3.	Representação esquemática da classificação de folículos antrais ao longo da foliculogênese	28
FIGURA 4.	Via de sinalização do TNF- α . Adaptado de Nature, (2010). Símbolos API1, proteína ativadora 1; CFLIP, proteína inibitória similar a FLICE celular (também conhecida como CFLAR); CIAP, inibidor celular da proteína da apoptose; FADD, domínio de morte associado a Fas; IKK, inibidor da quinase K; JNK, Jun cinase N-terminal; MAPK, proteína quinase ativada por mitogénio; MEKK, quinase cinase quinase ativada por mitogénio; MKK3, quinase 3 ativada por mitogénio de especificidade dupla; NEMO, modulador essencial do fator nuclear κ B (NF- κ B); RIP, proteína que interage com o receptor; TRADD, domínio de morte associado a TNFR1; TRAF, fator associado ao receptor de TNF.	33
FIGURA 5.	Via de sinalização da interleucina 1 (IL-1) mostrando as moléculas que estão envolvidas na cascata de sinalização. Interleucina 1 (IL-1), receptor de interleucina 1 (IL-1RI), receptor acessório da proteína da interleucina 1 (IL-1RAcP), proteína de diferenciação mieloide (MyD88), quinases associadas ao receptor de interleucina 1 (IRAKs), fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), proteína quinase NF- κ B indutoras de quinase (NIK), NF- κ B inibidor de proteínas (I- κ B), fator de transcrição nuclear (NF- κ B)	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Intensidade da expressão de proteínas para TNF- α TNFR-1 e TNFR-2 em 35
fóliculos bovinos.
- Tabela 2.** Intensidade da expressão de IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII e 37
localização do mRNA para IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII em
ovários bovinos.

ARTIGO I

FIGURE 1. Viable bovine secondary follicles cultured for 18 days after viability staining with calcein-AM (green staining) and ethidium homodimer-1 (red staining). Secondary follicle cultured in TCM-199+(control) (A,B), Secondary follicle cultured in medium containing IL- β (C,D), Secondary follicle cultured in medium containing TNF- α (E,F), Secondary follicle cultured in medium containing both and TNF- α and IL- β (G,H). Scale bars represent 100 μ m (100x magnification). 56

FIGURE 2. Levels of mRNA for *GDF-9* (A); *C-MOS* (B), *H1foo* (C) and *CYCLIN* (D) in secondary follicles (mean \pm SD) cultured *in vitro* for 18 days. Same uppercase letters (A) represent no significant differences between different treatments ($P > 0.05$). 57

Representative micrographs of secondary follicles after 18 days of culture in the presence of IL-1 β or TNF- α alone or in combination.

FIGURE 3.

Follicles from fresh control (A-B), cultured follicles in TCM-199+ (C-D), cultured follicles in IL-1 β (E-F), cultured follicle in TNF- α (G-H), cultured follicle in both IL-1 β and TNF- α (I-J). Bars are presented in the micrographs. ZP: zona pellucida; m: mitochondria; v: vacuole.

59

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

- Table 1.** Oligonucleotide primers used for PCR analysis of bovine cells and tissues 52
- Table 2.** Diameters (Mean \pm Standard Deviation) of isolated bovine follicles after 0, 6, 12 and 18 days of in vitro culture in TCM 199⁺ alone or supplemented with IL-1 β , TNF- α and both IL-1 β and TNF- α . 54
- Table 3.** Percentage of antrum formation of secondary follicles cultured for 18 days in TCM-199⁺ or supplemented with IL-1 β and / or TNF- α . 54
- Table 4.** Survival of bovine isolated secondary follicles cultured for 18 days in TCM-199⁺ supplemented with TNF- α and / or IL-1 β . 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAX	Proteína X associada ao BCL-2
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COC	Complexo cumulus-oócito
C-MOS	Fator de maturação nuclear Mos
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dTTP	Timidina trifosfato
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
Ct	Cycle threshold (Ciclo de threshold)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERK1	Quinase regulada por sinal extracelular do tipo 1
ERK2	Quinase regulada por sinal extracelular do tipo 1
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico básico 2
FGF-10	Fator de crescimento fibroblástico básico 10
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação 9
GH	Hormônio do Crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H1foo	Histona de ligação específica de oócito
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina

I-kB	NF-kB inibidoras de proteínas
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-1RA	Antagonista do receptor de IL-1
IL-1RAcP	Receptor acessório da proteína da interleucina 1
IL-1RI	Receptor de interleucina do tipo I
IL-1RII	Receptor de interleucina do tipo II
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
kDa	Kilodaltons
KL	Kit ligante
LH	Hormônio Luteinizante
MET	Microscopia Eletrônica de transmissão
mL	Mililitro
mM	Milímetro
NF-kB	Fator nuclear kappa beta
Ng	Nanograma
NGF	Fator de crescimento neural
NIK	Proteína quinase NF-kB indutora de quinase
Nm	Nanômetro
Ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico
P4	Progesterona
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
TACE	Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (Enzima conversora do fator de necrose tumoral α)
TGF- β	Fatores de crescimento transformante beta

TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral alpha do tipo I
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral alpha do tipo II
TCM199	Meio de cultivo tecidual 199
TCM199 ⁺	Meio de cultivo tecidual 199 suplementado

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Caracterização do ovário mamífero	21
2.2	Oogênese	22
2.3	Foliculogênese ovariana e caracterização folicular.....	24
2.3.1	<i>Formação e crescimento de folículos primordiais</i>	24
2.3.2	<i>Crescimento de folículos primários e secundários</i>	24
2.3.3	<i>Crescimento folicular na fase antral (terciários e pré-ovulatórios)</i>	26
2.4	Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> para folículos pré-antrais.....	28
2.5	Técnicas de avaliação folicular após cultivo <i>in vitro</i>	29
2.6	Citocinas na reprodução de fêmeas	32
2.6.1	<i>As citocinas e as funções na fisiologia ovariana</i>	32
2.6.2	<i>Importância do Sistema TNF-α no ovário de fêmeas mamíferas</i>	32
2.6.3	<i>Caracterização do Sistema Interleucina-1 (IL-1) na foliculogênese ovariana</i>	35
2.7	Crescimento oocitário e estoque de RNAs mensageiros	38
2.7.1	<i>GDF-9 e membros da família SMAD</i>	38
2.7.2	<i>Membro O da família das Histonas H1, específica para oócitos (H1foo)</i>	39
2.7.3	<i>Ciclina B1</i>	39
2.7.4	<i>Quinase C-MOS</i>	40
3	JUSTIFICATIVA	41
4	HIPOTETES	42
5	OBJETIVOS	43
5.1	Objetivos gerais	43
5.2	Objetivos específicos.....	43
6	ARTIGO : Effect of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) on <i>in vitro</i> development of isolated bovine secondary follicles	44
7	CONCLUSÕES	67
8	PERSPECTIVAS	68
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias reprodutivas vêm se destacando no cenário nacional e internacional, criando oportunidades extraordinárias para a reprodução animal, especialmente no que se refere ao aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos de elevado potencial econômico. A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil lidera o ranking de maior exportador de carne bovina do mundo desde 2008 e hoje é o segundo maior produtor, com mais de 212,34 milhões de animais, superado apenas pelos Estados Unidos, responsável por 17% da produção total (IBGE, 2015). A criação de rebanho bovino apresenta um impacto significativo no cenário socioeconômico mundial, atuando como fonte de renda para criadores, além de produzir alimento de alto valor nutricional e contribuir com valioso material genético voltado às pesquisas para reprodução animal.

Dentre as biotecnologias utilizadas com maior frequência na produção animal, destacam-se a Inseminação Artificial (IA), a Fecundação *in vitro* (FIV) e a Transferência de Embriões (TE). Atualmente, o Brasil destaca-se como primeiro país do mundo em número de embriões produzidos *in vitro* (IETS, 2014). Além das biotécnicas supramencionadas, existe técnicas que apresentam boas perspectivas para aplicação no futuro, como a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), a qual vem sendo bastante explorada por sua potencialidade em aproveitar a abundância oocitária presente no ovário. Avanços no desenvolvimento da biotécnica de MOIFOPA envolvem essencialmente duas estratégias. A primeira baseia-se no estudo *in vivo* da presença, distribuição e níveis de expressão de diversas substâncias nas diferentes categorias foliculares; já a segunda, concerne à avaliação de diversos fatores, ou seja substâncias intra e extra-ovarianas, meios de cultivo de base, concentração de gases, matrizes extracelulares, sistemas de cultivo, dentre outros, sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos pré-antrais crescidos *in vitro*. Desta forma, a utilização da biotécnica de MOIFOPA poderia incrementar a produção *in vitro* de embriões através do fornecimento de um elevado número de oócitos maduros que poderiam ainda ser utilizados para o incremento na eficiência das biotécnicas de clonagem e transgenia, as quais têm aplicação direta na produção de biofármacos. Assim, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos aplicados, o desenvolvimento e aprimoramento de biotécnicas da reprodução, são necessários para aumentar a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos. Para isto, torna-se necessário a compreensão da fisiologia ovariana em bovinos e o desenvolvimento de métodos eficientes que possibilitem avaliar os efeitos de substâncias que estão envolvidas no controle da foliculogênese.

Os estudos *in vivo* e *in vitro* são de grande importância, pois apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante as duas últimas décadas, o entendimento completo dos mecanismos que controlam o desenvolvimento folicular, a ovulação e a maturação oocitária ainda não foi alcançado. Desta forma, o modelo bovino vem sendo utilizado na identificação de fatores envolvidos na ativação, desenvolvimento e seleção folicular, maturação oocitária, ovulação e luteólise (FERREIRA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2011; GASPERIN *et al.*, 2012; TONELLOTTI DOS SANTOS *et al.*, 2012; BARRETA *et al.*, 2013; GASPERIN *et al.*, 2014; PASSOS *et al.*, 2016; BEZERRA *et al.*, 2016). Dentre estes fatores, pode-se destacar as citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 β (IL-1 β) que desempenham importante papel tanto na ovulação como na função folicular (MORRISON *et al.*, 2002). Um conceito emergente é que as citocinas são importantes reguladores intraovarianos, que podem modular ações relativas à foliculogênese, ovulação, e função do corpo lúteo, revelando a importância dos sistemas TNF- α e IL-1 β nas alterações funcionais e estruturais no ovário em todas as fases do ciclo ovariano (PASSOS *et al.*, 2016; SILVA, 2016)

Visando uma melhor compreensão do assunto, a revisão de literatura a seguir abordará inicialmente os aspectos gerais relacionados à oogênese e foliculogênese. Além disso, serão discutidos a caracterização do ovário mamífero, oogênese, foliculogênese ovariana e caracterização folicular, sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, técnicas de avaliação de avaliação folicular após o cultivo *in vitro*, citocinas na reprodução das fêmeas, crescimento oocitário e estoque de RNAs mensageiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterizações do ovário mamífero

O ovário é o órgão principal do sistema reprodutor feminino, cuja maior função é a diferenciação e liberação de um oócito maduro para fertilização e propagação das espécies (McGEE; HSUEH, 2000). Durante o ciclo estral, o ovário passa por grandes e previsíveis mudanças fisiológicas e morfológicas em um período curto de tempo (SENGER, 2003), destacando-se por ser um órgão complexo que desempenha funções endócrinas e gametogênicas (BRISTOL-GOULD *et al.*, 2006). Além da produção de oócitos aptos à fertilização, o ovário também é fonte de esteroides sexuais que permitem o desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas e manutenção da gestação (STEFANSDOTTIR *et al.*, 2014).

Este órgão heterogêneo é constituído por duas regiões distintas: medular, constituída por tecido fibroelástico que representa a porção interna do ovário e alojam os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, assim como tecido conjuntivo denso, sendo estas estruturas responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (HAFEZ *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006). A região cortical do ovário contém inúmeros folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, corpos hemorrágicos, lúteos, albicans e uma população de células mesenquimais pouco diferenciadas, muito semelhantes às células mesenquimatosas embrionárias, que podem sofrer grandes e complexas modificações durante a vida reprodutiva (FIGURA1). (KNIGHT; GLISTER, 2006).

O ovário é circundado por uma camada simples de células cuboidais chamada de epitélio germinativo e encontra-se também uma camada de tecido conjuntivo conhecido como túnica albugínea aonde se aloja a população de folículos ovarianos quiescentes. O folículo ovariano é a unidade funcional básica do ovário, responsável por proporcionar um ambiente ideal para a sobrevivência, o crescimento e a maturação oocitária, formado por uma célula germinativa (oócito) e células somáticas (da granulosa e tecais) (CORTVRINDT; SMITZ, 2001).

Os fatores produzidos pelos diferentes tipos celulares do ovário contribuem para a formação de um sistema bastante complexo que regula a produção de gametas e hormônios (ERICKSON; SHIMASAKI, 2003). Estas funções são exercidas pela interação da oogênese e a foliculogênese que são dois fenômenos que ocorrem no ovário e correspondem a processos biológicos complexos e coordenados que induzem mudanças morfológicas e funcionais dentro

do folículo, conduzindo à diferenciação de células e ao desenvolvimento dos oócitos (BONNET; DALBIÈS-TRAN; SIRARD, 2008).

Figura 1

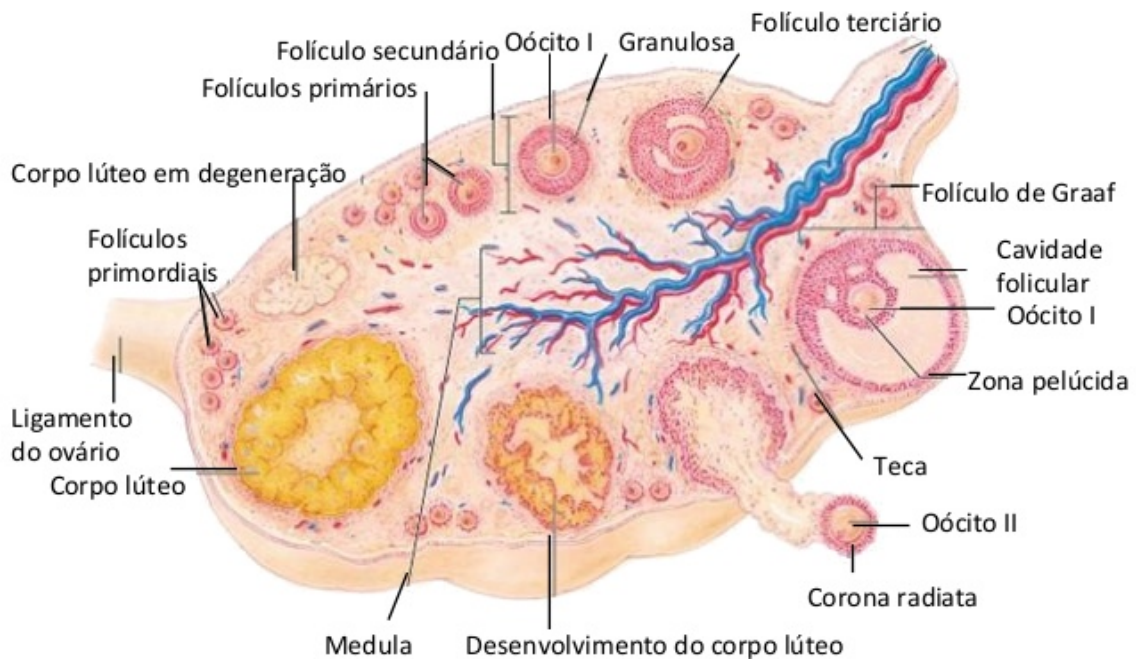


Figura 1. Desenho esquemático do corte transversal do ovário de mamíferos representando os folículos ovarianos, corpos lúteos e albicans na região cortical e vasos na região medular. FONTE: disponível em WWW.uqtr.ca/Actualite/Entete (adaptado)

2.2 Oogênese

A oogênese consiste na formação e diferenciação do gameta feminino, e inicia-se ainda na vida fetal (MCGEE *et al.*, 2000). No embrião bovino, por volta do 35º dia de gestação (ERICKSON *et al.*, 1966), originam-se, as células germinativas primordiais (CGPs) originadas no epiblasto proximal, adjacente ao ectoderma extra embrionário. As CGPs migram para as cristas genitais, onde se diferenciam em oogônias e se multiplicam formando agregados celulares circundados por células somáticas provenientes do mesonefro (JAGARLAMUDI E RAJKOVIC 2012). Através de movimentos amebóides, as CGPs migram através do intestino médio até alcançarem a crista genital onde se diferenciam e se multiplicam. Nem todas as CGP irão obter sucesso nesta migração; aquelas que não alcançarem a crista genital irão degenerar

(ADAMS *et al.*, 2008). Durante esse percurso até a crista genital, as CGPs estão sofrendo mitoses e aumentando significativamente em número para compor o futuro reservatório folicular (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005).

Quando as CGPs chegam na crista genital, elas estimulam o tecido conjuntivo local a se proliferar. Isso resulta na formação de cordões compactos de tecido chamados de cordões sexuais primitivos promovendo o crescimento das cristas genitais (FREMAN, 2003). Após sofrerem extensiva proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas, as CGPs diferenciam-se em oogônias e se multiplicam formando agregados celulares circundados por células somáticas provenientes do mesonefro. (SADEU *et al.*, 2006).

A última divisão mitótica das oogônias para se transformar em oócitos constitui uma etapa importante, pois o oócito primário entrará na fase de prófase I da primeira divisão meiótica (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Quando concluir as fases de leptóteno, zigóteno, paquíteno e alcançar a fase de diplóteno da prófase I, o núcleo do oócito primário se tornará dormente e permanecerá assim até que seja estimulado pelas gonadotrofinas após a puberdade (SUH; SONNTAG; ERICKSON, 2002). Logo após o nascimento, as fêmeas apresentam um período de incremento somático e desenvolvimento no qual há o aumento no crescimento corporal, porém as gônadas permanecem relativamente estáveis. Durante este período de crescimento, alguns dos oócitos primários começam a acumular grandes volumes de citoplasma e a desenvolver uma estrutura circular translúcida em volta do citoplasma conhecida como zona pelúcida (SENGER, 2003).

A progressão da divisão meiótica ocorre somente na puberdade, com a liberação do pico pré-ovulatório do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) (MCGEE *et al.*, 2000); os oócitos concluem seu crescimento e retomam a meiose, reativando o núcleo para que este saia da fase de diplóteno da prófase I e passe para a diacinese (CECCONI *et al.*, 2004). Com o rompimento da vesícula germinativa, o oócito evolui para as fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, culminando com a expulsão do primeiro corpúsculo polar; originando o oócito secundário. Este iniciará a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (GORDON *et al.*, 1994) e somente após a fecundação do oócito pelo espermatozoide, com a formação do oócito haploide fecundado, a oogênese é concluída (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

2.3 Folliculogênese ovariana e caracterização folicular

2.3.1 Formação e crescimento de folículos primordiais

Os folículos primordiais constituem a reserva de células germinativas durante todo o período da vida reprodutiva feminina e representam cerca de 95% do total de folículos pré-antrais presentes no ovário (ERICKSON, 1986). Estes folículos possuem diâmetro médio de 20 μ m em bovinos (HULSHOF *et al.*, 1994). Após sua formação, cada folículo primordial tem três possíveis destinos: (1) permanecer quiescente; (2) ser ativado para o pool de crescimento (seguido pela atresia, em um estágio mais avançado de desenvolvimento, ou pela ovulação) ou (3) sofrer atresia diretamente no estágio de folículo quiescente (REDDY; ZHENG; LIU, 2010).

Os sinais de ativação dos folículos primordiais incluem a retomada da proliferação das células da granulosa (VAN DEN HURK; BEVERS; BECKERS, 1997) e a mudança na morfologia dessas células de pavimentosas para cúbicas. O controle do mecanismo de ativação é feito por fatores inibitórios, que mantêm o folículo primordial em estado de dormência, e estimulatórios, responsáveis pela promoção da sobrevivência e ativação destes folículos (MONNIAUX *et al.*, 2014). O kit ligand (KL), também conhecido como fator de células-tronco (Stem cell factor – SCF), e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), por exemplo, foram relatados como fatores necessários à ativação de folículos primordiais bovinos (bFGF: TANG *et al.*, 2012). Além disso, gonadotrofinas, como o hormônio folículo estimulante (FSH), promovem a ativação de folículos primordiais, bem como o crescimento dos folículos ativados, uma vez que o FSH parece estar envolvido na proliferação e diferenciação das células da granulosa *in vitro* (MATOS *et al.*, 2007a; MAGALHÃES *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2012). Assim, os fatores endócrinos (gonadotrofinas) e fatores intraovarianos (fatores de crescimento e peptídeos) são os principais responsáveis pelo controle dessa ativação e do crescimento desses folículos (PICTON *et al.*, 2008).

2.3.2 Crescimento de folículos primários e secundários

Após a ativação, surgem os folículos de transição que são folículos primordiais que gradualmente adquiriram células da granulosa de formato cúbico. Em seguida, quando todas as células que circundam o oócito tornam-se cúbicas, aumentando em número e volume, os folículos são chamados folículos primários (VAN DEN HURK; BEVERS; BECKERS, 1997, FIGUEIREDO *et al.*, 2008; PAN *et al.* 2012). Os folículos primários possuem diâmetro médio

de 34,7 μ m e apresentam-se com uma camada completa de células da granulosa. Com a multiplicação destas células, ocorre a formação dos folículos secundários, cujo diâmetro médio é de 58,94 μ m (FORTUNE *et al.*, 2000), caracterizados por possuírem duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas ao redor do oócito (FIGURA 2). Com o desenvolvimento desses folículos, a zona pelúcida torna-se mais evidenciada (LUCCI *et al.*, 2001), bem como a inicia-se a formação das células da teca externa a partir do estroma intersticial (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Nesta fase do desenvolvimento folicular, além do núcleo do oócito encontrar-se em uma posição excêntrica, as organelas começam a mover-se para a periferia. O número de retículos endoplasmáticos lisos aumenta e a grande maioria das mitocôndrias apresentam-se alongadas. À medida que os folículos crescem, as proteínas que constituem a zona pelúcida começam a ser sintetizadas (LEE, 2000). A multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas destas células ao redor do oócito, dando origem aos folículos secundários, que possuem diâmetro que variam de 150 a 700 μ m (LUNDY *et al.*, 1999, PRAVEEN CHAKRAVARTHI *et al.*, 2015).

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido, a qual caracteriza a classe de folículos antrais onde estão presentes os folículos nos estágios de terciários e pré-ovulatórios (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Figura 2

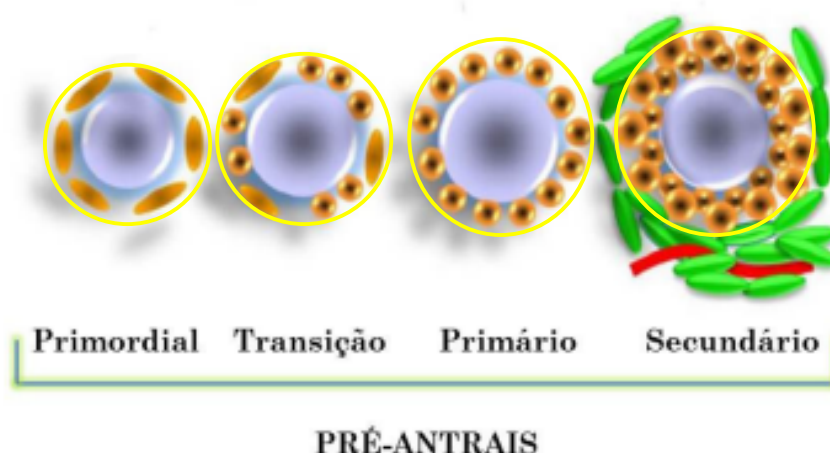


Figura 2. Classificação dos folículos pré-antrais de acordo com o estágio de desenvolvimento (adaptado de CHAVES, 2011)

2.3.3 Crescimento folicular na fase antral (terciários e pré-ovulatórios)

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

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

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

Durante o desenvolvimento folicular na fase antral ocorrem três eventos principais, o recrutamento, a seleção e a dominância (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Além das gonadotrofinas, algumas substâncias que são produzidas localmente, dentre as quais pode-se destacar os peptídeos, que exercem um papel essencial no processo regulatório da fase antral, tanto por meio de mecanismos endócrinos como parácrinos (FORTUNE, 2003). Durante o recrutamento folicular, um grupo de folículos torna-se dependente das gonodotrofinas e inicia seu desenvolvimento (BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995).

Dos folículos que foram recrutados a partir de um determinado grupo, somente um será selecionado para continuar se desenvolvendo (folículo dominante), mesmo em níveis baixos de FSH. Enquanto isso, os outros folículos (subordinados) começam a sofrer atresia, caracterizando esse processo como divergência folicular (GINTHER *et al.*, 1996). O folículo

dominante reduz de forma passiva a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH), ou seja, os hormônios produzidos pelas células da granulosa do folículo dominante, estradiol e inibina, diminuem a liberação de FSH. A baixa concentração de FSH interrompe o desenvolvimento dos folículos subordinados, mas ainda é suficiente para promover o crescimento do folículo dominante (ALVES *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado que a dinâmica folicular acontece observando um padrão de ondas de crescimento folicular ao longo do ciclo estral, sendo que poderão ocorrer duas (PIERSON & GINTHER, 1988; GINTHER; KNOPF & KASTELIC, 1989; FIGUEIREDO *et al.*, 1997) ou três ondas foliculares (SAVIO *et al.*, 1988; GAMBINI *et al.*, 1998; CASTILHO *et al.*, 2000). O número de ondas em que o crescimento folicular está envolvido pode sofrer influências de diversos fatores, dentre os quais pode-se destacar: o tempo de duração da fase luteínica (BARUSELLI *et al.*, 1997), baixa ingestão de nutrientes (MURPHY *et al.*, 1991), níveis plasmáticos de FSH e inibina-A (PARKER *et al.*, 2003).

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

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

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

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

Figura 3

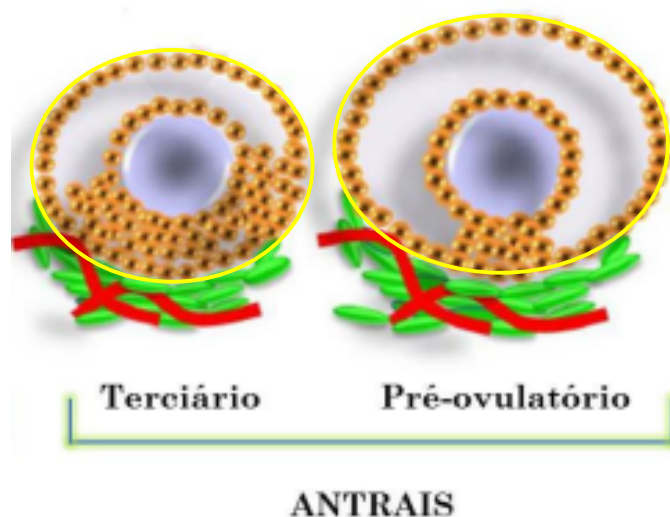


Figura 3. Classificação dos folículos antrais de acordo com o estágio de desenvolvimento (adaptado de CHAVES, 2011)

2. 4 Sistemas de cultivo *in vitro* para folículos pré antrais

Visando evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* por apoptose, nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos vários modelos de isolamento e cultivo folicular *in vitro* que possibilitam o estudo dos fatores que controlam o crescimento e maturação folicular. Diferentes métodos enzimáticos para isolar folículos ovarianos pré-antrais a partir de ovários já foram desenvolvidos para camundongos, ratos, hamsters, coelhos, suínos, bovinos, caprinos e humanos (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). As principais enzimas utilizadas para o isolamento folicular são a colagenase e a DNase. Os tratamentos enzimáticos possibilitam a recuperação de um grande número de folículos pré-antrais, mas podem danificar a membrana basal ou células da teca quando o tempo de incubação não é rigorosamente controlado. Um método mecânico desenvolvido por (FIGUEIREDO *et al.* 1993) possibilita o isolamento de até 70.000 pequenos folículos pré-antrais (< 100 μ m) por ovário bovino (De Bem *et al.*, 1997).

Este método também diminui possibilidade de causar danos na membrana basal durante o isolamento (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

Para o isolamento de grandes folículos pré-antrais (150-200 μ m) tem sido utilizado a técnica de microdissecação, que isola os folículos do estroma ovariano com o auxílio de agulhas. Esta técnica possibilita a manutenção da integridade das camadas tecais presentes em grandes folículos pré-antrais (TELFER, 1998). Nos últimos anos, diversos sistemas de cultivo *in vitro* foram desenvolvidos para folículos pré-antrais. Os principais métodos realizam o cultivo dos folículos diretamente sobre o suporte de plástico, sobre uma matriz de colágeno ou inclusos em gotas de colágeno (DEMEESTERE *et al.*, 2005). O cultivo de folículos pré-antrais em suporte de plástico tem sido realizado principalmente para grandes folículos pré-antrais isolados mecanicamente do estroma ovariano (SMITZ, CORTVRINDT, 2002). O segundo sistema de cultivo possibilita o crescimento de folículos isolados sobre uma matriz de colágeno. Este sistema tem sido utilizado com sucesso, permitindo o crescimento de oócitos, inclusos em folículos pré-antrais, até estarem aptos à fertilização. Outros componentes da matriz extracelular (fibronectina, colágeno tipo I e laminina) podem ser utilizados como substratos para adesão folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). Esse sistema já foi utilizado em diferentes espécies (suína: LIU *et al.*, 2003; caprina: BARROS *et al.*, 2013; ovina: BARBERINO *et al.*, 2015; bovina: ARAÚJO *et al.*, 2014).

No terceiro sistema de cultivo, os folículos isolados são incluídos em gotas de colágeno, sendo a principal vantagem possibilitar a manutenção da estrutura tridimensional dos folículos cultivados *in vitro*. A utilização de componentes da matriz extracelular é importante para a preservação da morfologia folicular, bem como para reduzir ou abolir as perdas foliculares durante as trocas de meio (TELFER, 1998; FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

Com relação aos principais avanços obtidos com o cultivo folicular, grandes folículos pré-antrais (150 μ m) de bovinos (McCAFFERY; GUTIERREZ *et al.*, 2000, McLAUGHLIN *et al.* 2010; ROSSETTO *et al.*, 2013) foram cultivados *in vitro* e chegaram até formação de antro. Além disso, folículos secundários bovinos isolados, apresentaram alta porcentagem de folículos viáveis após 16 dias de cultura *in vitro* (ROSSETTO *et al.*, 2013). Em suínos, folículos pré-antrais crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO *et al.*, 1994). Finalmente, a produção de embriões e o nascimento de 53 camundongos viáveis foram obtidos a partir de oócitos de folículos pré-antrais que foram cultivados, maturados e fecundados *in vitro* (O'BRIEN *et al.*, 2003).

2.5 Técnicas de avaliação folicular após o cultivo *in vitro*

A otimização da exploração do potencial reprodutivo das fêmeas requer uma compreensão mais ampla dos mecanismos que controlam o crescimento e o desenvolvimento folicular após um determinado período de cultivo *in vitro*. Além disso, uma avaliação precisa da eficiência do cultivo *in vitro* permite o monitoramento das alterações ocorridas, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais. Assim, o entendimento dos eventos ocorridos durante a foliculogênese, associados à técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, Microscopia de Fluorescência e Microscopia Eletrônica de Transmissão, poderão ser úteis na elucidação da fisiologia ovariana de mamíferos e, conseqüentemente, na otimização da eficiência reprodutiva destes animais.

A PCR em tempo real combina amplificação e quantificação em uma mesma etapa. Isso é alcançado utilizando-se uma variedade de produtos químicos fluorescentes que correlacionam a concentração do produto da PCR com a intensidade da fluorescência (HIGUCHI *et al.*, 1993). Esta é uma técnica útil para a amplificação *in vitro*, de seqüências de DNA usando oligonucleotídeos iniciadores ou primers de seqüência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA-alvo, em ciclos repetidos (MULLIS, 1990). Para esta reação, utiliza-se da enzima Taq- DNA polimerase extraída da bactéria termoestável *Thermus aquaticus*, sendo realizada em um termociclador. Além da enzima Taq - DNA polimerase, os constituintes desta reação são o DNA molde, os iniciadores (primers), os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), cloreto de magnésio (MgCl₂) e um tampão.

A análise da expressão gênica tem adquirido importância em muitos campos de pesquisa biológica. O conhecimento acerca dos padrões de expressão de genes deve fornecer um melhor entendimento dos complexos sistemas regulatórios e irá, provavelmente, levar à identificação de genes relevantes para novos processos biológicos. Além disso, muitos eventos que ocorrem nas células dos folículos ovarianos, tais como sobrevivência, crescimento e diferenciação são mediados a partir da alteração dos padrões de expressão gênica. Contudo, a possibilidade de se quantificar os níveis de transcrição de genes específicos é de fundamental importância para qualquer investigação das funções foliculares (ZAMORANO *et al.*, 1997)

A Microscopia de Fluorescência é uma técnica utilizada na análise de viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados do ambiente ovariano (BRUNO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010). Esta técnica utiliza marcadores fluorescentes, que quando

excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). É considerada uma técnica confiável, prática e rápida para analisar a viabilidade folicular (CORTVRINDT & SMITZ, 2001; LOPES *et al.*, 2009), tendo sido, portanto, empregada para avaliação da viabilidade de folículos pré-antrais após o cultivo *in vitro* em diversos trabalhos (BRUNO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Para a análise de viabilidade de folículos pré-antrais ou oócitos por fluorescência, os marcadores comumente utilizados são o etídio homodímero-1 e calceína-AM, que permitem a detecção simultânea de células mortas (etídio homodímero-1) e vivas (calceína-AM). O etídio homodímero-1 marca ácidos nucleicos em células não viáveis, indicando a perda da integridade da membrana plasmática celular (LOPES *et al.*, 2009), enquanto a atividade enzimática (esterases) no citoplasma é detectada nas células foliculares através do composto calceína-AM (SCHOTANUS *et al.*, 1997; VAN DEN HURK *et al.*, 1998), que é clivado por enzimas esterase em células vivas, resultando em um produto fluorescente (DE CLERCK *et al.*, 1994). As sondas fluorescentes calceína-AM e etídio homodímero-1 já haviam sido utilizadas com sucesso para avaliação da viabilidade de folículos bovinos em estágios iniciais (SCHOTANUS *et al.*, 1997; VAN DEN HURK *et al.*, 1998). Além disso, esta técnica é empregada no intuito de avaliar a configuração da cromatina de oócitos oriundos de folículos pré-antrais, indicando assim o estágio meiótico alcançado após terem sido cultivados e maturados *in vitro* (SARAIVA *et al.*, 2010).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é considerada uma boa técnica para avaliação das membranas celulares e das mudanças ultra-estruturais (SALEHNIA *et al.*, 2002) ocorridas durante o desenvolvimento e a atresia folicular, sendo, portanto, um método mais preciso e eficiente do que a histologia clássica para avaliar os folículos pré-antrais. Tal técnica é capaz de identificar alterações ocorridas durante o cultivo *in vitro* que não foram visíveis durante a análise morfológica, utilizando-se microscópio óptico. Isso porque o emprego da MET permite uma maior ampliação do material estudado e melhor visualização dos elementos celulares. Um microscópio eletrônico de transmissão pode chegar até um aumento de 180.000 vezes, com um limite de resolução de 0,45 nm, o que fornece ao pesquisador resultados cada vez mais precisos e relevantes.

Em 2006, Matos e colaboradores realizaram análises histológicas e ultraestruturais após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e após cinco dias de cultivo, evidenciou-se uma elevada percentagem de folículos histologicamente normais. No entanto, os estudos ultraestruturais não confirmaram a manutenção da integridade morfológica desses folículos. Já

em outros estudos com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, os resultados obtidos por histologia clássica puderam ser confirmados por MET (MATOS *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008; ROSSETTO *et al.*, 2009; LIMA-VERDE *et al.*, 2010).

2.6 Citocinas na reprodução de fêmeas

2.6.1 As citocinas e as funções na fisiologia ovariana.

As citocinas exercem várias funções no ovário, pois estão envolvidas nos processos de crescimento folicular, esteroidogênese, recrutamento e ativação de leucócitos necessários para a ovulação e remodelação tecidual durante a luteinização, ovulação e luteólise (BUSCHER *et al.*, 1999). A ovulação em mamíferos pode ser considerada uma reação inflamatória e os folículos ovarianos representam um local de síntese, recepção e ação do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (BRANNSTROM *et al.*, 1995; ROBY *et al.*, 1990) e da interleucina-1 β (IL-1 β) (BRANNSTROM *et al.*, 1993b). Esses peptídeos afetam diretamente a função secretora das células da teca e/ou das células da granulosa, com efeito estimulante ou inibitório sobre a biossíntese de prostaglandinas e esteroidogênese (OTANI *et al.*, 1996).

2.6.2 Importância do Sistema TNF- α no ovário de fêmeas mamíferas

O TNF- α é uma proteína com 17,3 kDa que foi identificada nos ovários de vários animais, incluindo coelhas (Bagavandoss *et al.*, 1990), vacas (ROBY *et al.*, 1989) e os seres humanos (ROBY *et al.*, 1990). Em ovário 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). Este peptídeo foi mostrado por inibir a secreção de estradiol, bem como a secreção de progesterona em células da granulosa de ratos, suínos, bovinos e humanos (SPICER, 1998; VELDHUIS *et al.*, 1991; RICE *et al.*, 1996).

O TNF- α age ligando-se a um de seus dois subtipos de receptores distintos: receptor do tipo I (TNFR1), que é de aproximadamente 60 kDa (p60) 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 . Oócitos e células do cumulus humanos expressam tanto o RNAm quanto a proteína para TNF- α e seu receptor do tipo II (TNFR2) (NAZ *et al.*, 1997). A figura 4 mostra detalhadamente a via de sinalização do TNF- α .

Figura 4

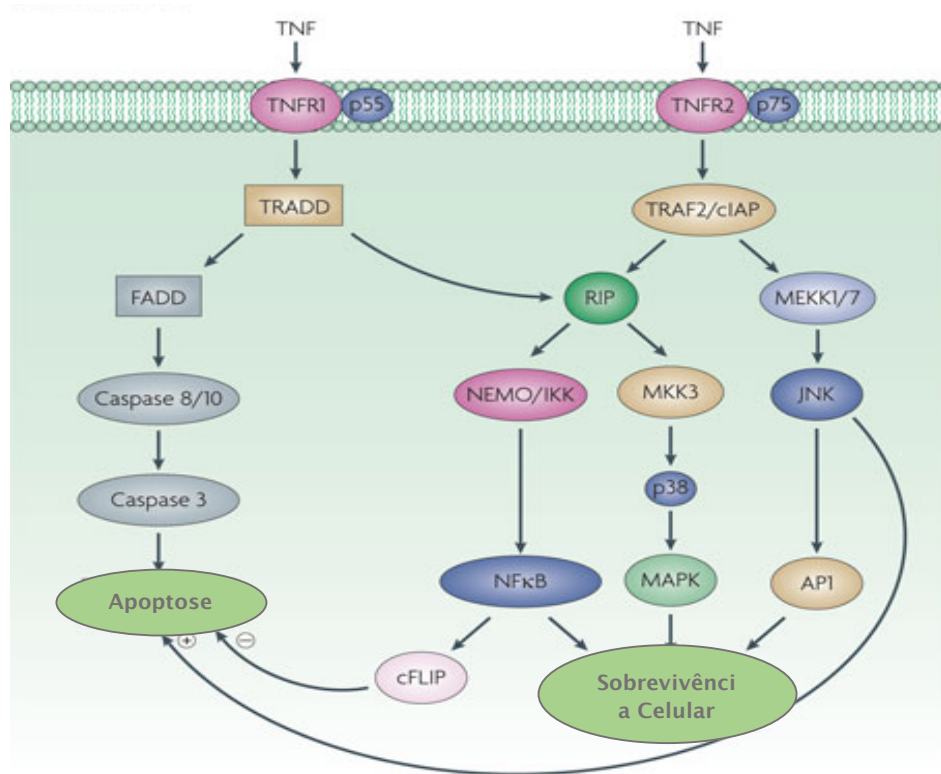


Figura 4. Via de sinalização do TNF- α . Adaptado de Nature, (2010). Símbolos AP1, proteína ativadora 1; CFLIP, proteína inibitória similar a FLICE celular (também conhecida como CFLAR); CIAP, inibidor celular da proteína da apoptose; FADD, domínio de morte associado a Fas; IKK, inibidor da quinase K; JNK, Jun cinase N-terminal; MAPK, proteína quinase ativada por mitogénio; MEKK, quinase cinase quinase ativada por mitogénio; MKK3, quinase 3 ativada por mitogénio de especificidade dupla; NEMO, modulador essencial do fator nuclear κ B (NF- κ B); RIP, proteína que interage com o receptor; TRADD, domínio de morte associado a TNFR1; TRAF, fator associado ao receptor de TNF.

A expressão de receptores para TNF- α também foi determinada nas células da granulosa em bovinos (SPICER *et al.*, 2001). Além disso, o TNF- α imunorreativo está presente em folículos bovinos durante o desenvolvimento folicular (SPICER, 1998). Em humanos, a expressão do TNF- α aumenta gradativamente durante as fases foliculares, atingindo o nível máximo em todo do período pré-ovulatório (ZOLTI, *et al.*, 1992). Portanto, é provável que o TNF- α produzido localmente no ovário desempenhe um papel importante na regulação do desenvolvimento folicular ovariano em várias espécies.

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) e as cascatas de sinalização do TNF ovariano que regulam a esteroidogénese atuam mais provavelmente através do receptor TNF p55 do tipo 1 (TNFR1) (ROBY *et al.*, 1999) do que do receptor TNF p75 do tipo 2 (TNFR2) (NAKAYAMA *et al.* 2003). O TNF exerce a sua função

através da porção interna de TNFR1 contendo três domínios funcionais: 1) domínio de morte C-terminal, 2) domínio ativador de esfingomielina ácida e 3) domínio ativador de esfingomielina neutra (ZHANG *et al.*, 1998). Cada domínio liga-se a proteínas distintas e ativa proteínas de sinalização a jusante incluindo MAPK, ceramida, caspase, proteína de ativação 1 (AP-1) e fator nuclear (NF) -KB. A família Jun (c-Jun, Jun-B e Jun-D), uma família de fatores básicos de transcrição de leucina (bZIP), forma homodímeros ou heterodímeros entre os membros da família Jun, os membros da família Fos (c-Fos, Fos- B, Fra-1 e Fra-2) e fator de transcrição ativante 2 (ATF-2). O dímero liga-se aos locais da sequência de DNA (TGAC / GTCA) chamados AP-1 encontrados numa variedade de promotores (KYRIAKIS; LEPPA 1999). Os papéis funcionais dos fatores de transcrição AP-1 envolvem vários processos celulares incluindo ciclo celular, oncogênese ou apoptose. Em particular, c-Jun regula diferencialmente apoptose, proliferação ou diferenciação de uma célula específica (MECHTA-GRIGORIOU *et al.*, 2001). É bem conhecido que o TNF pode afetar a apoptose das células granulosa (BASINI *et al.*, 2002), a proliferação (NAKAYAMA *et al.*, 2003) e a diferenciação (PRANGE-KIEL *et al.*, 2001). Quando o TNFR2 ligado ao TNF alfa interage com o fator 2 associado ao TNFR (TRAF2), a expressão de Sobrevivência / antiapoptóticos é regulada.

Em adição, estudos apontam que o TNF- α em associação a progesterona (P4) pode interagir na regulação do crescimento de folículos primordiais (NILSSON *et al.*, 2006). Em síntese, 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). No entanto, estudos *in vitro* afirmam que a exposição de oócitos suínos ao TNF- α (200ng/mL) causa uma redução na maturação oocitária (CAI-HONG *et al.*, 2010).

Recentemente, Silva (2017) demonstrou que as proteínas para o sistema TNF- α (TNF- α , TNFR1 e TNFR2) são expressas em vários compartimentos foliculares em ovários bovinos. As proteínas para TNF- α e TNFR1 são moderadamente expressas em oócitos de folículos primordiais e primários, bem como em oócitos, células da granulosa e da teca de folículos secundários a antrais. Com relação ao TNFR2, folículos primordiais e primários apresentam uma expressão moderada desta proteína, enquanto que uma alta expressão foi identificada em oócitos, células da granulosa e teca de folículos secundários (Silva, dados não publicados). A presença de proteínas para os membros do TNF- α (TNF- α , TNFR1 e TNFR2) nos folículos primordial, primário, secundário e antral destaca um efeito autocrino e paracrino do TNF- α

durante o desenvolvimento folicular em mamíferos. A tabela 1 ilustra detalhadamente a expressão do sistema TNF- α em folículos pré-antrais bovinos.

Com relação à ação do TNF- α no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos, um estudo recente demonstrou que o TNF- α em concentrações superiores a 10 ng/ml reduz a porcentagem de folículos primordiais / primários normais ao final de 6 dias de cultivo de tecido ovariano (Silva, 2016). Além disso, este estudo também relatou um concomitante aumento no número de células apoptóticas no tecido ovariano bovino cultivado na presença de TNF- α por 6 dias. Estudos anteriores mostraram que o TNF- α induz a morte de oócitos, granulosa e células luteais (Chen *et al.*, 1993, Kaipia *et al.*, 1996, Sasson *et al.*, 2002, Abdo *et al.*, 2003), bem como apoptose em culturas primárias de células de granulosa oriundas de folículos pré-ovulatórios de ratas (Sasson *et al.*, 2002). No entanto, em outros tipos celulares, Fisher *et al* (2011) demonstraram que o TNF- α pode ligar-se ao TNFR2 e atuar nos processos de regeneração de tecidos e neuroproteção. Estes autores mostraram que a proteção contra a morte celular depende da ativação do TNFR2 e da via PI3K-PKB / Akt.

Tabela 1. Intensidade da expressão de proteínas para TNF- α TNFR-1 e TNFR-2 em folículos bovinos.

(-) ausente; (+) reação imohistoquímica fraca, (++) moderada; ou (+++) forte

Estrutura	TNF-α	TNFR1	TNFR2
Folículo primordial			
Oocito	+++	+++	++
Células da granulosa	-	-	-
Folículo primário			
Oocito	+++	+++	++
Células da granulosa	-	-	-
Folículo Secundário			
Oocito	++	+++	+++
Células da granulosa	++	++	+++
Células da Teca	-	-	++

Fonte: Adaptado de Silva (dados não publicados)

2.6.3 Caracterização do Sistema Interleucina-1 (IL-1) na foliculogênese ovariana

A interleucina-1 (IL- 1 β) foi inicialmente identificada como reguladora do sistema imunológico, mas também afeta as funções do ovário (ADASHI *et al.*, 1990). O sistema Interleucina-1 (IL-1) é composto por dois ligantes bioativos, IL-1 α e IL-1 β (DINARELLO *et*

al., 1994), dois receptores, IL-R1 e IL-R2 (SIMS *et al.*, 1994), (Figura 5) e um antagonista do receptor IL-1RA, que regula a atividade biológica da IL-1 por uma fixação competitiva sobre os receptores (AREND *et al.*, 1991). Todos eles são expressos ou apresentam efeitos sobre uma grande variedade de tecidos, incluindo as células do ovário (KOL *et al.*, 1999). A figura 5 mostra detalhadamente a via de sinalização da IL-1 β . Estudos *in vitro* mostraram que IL-1 β regula algumas atividades das células da granulosa e das células da teca, como esteroidogênese e promove a ovulação em ratas (BRANNSTROM *et al.*, 1993b) e coelhas (TAKEHARA Y *et al.*, 1994). Além disso, a IL-1 β induz o rompimento da vesícula germinativa de oócitos em coelhas (TAKEHARA *et al.*, 1994) e induz a retomada da meiose em oócitos eqüinos (MARTORIATI *et al.*, 2002), sugerindo um papel potencial de IL-1 β na maturação nuclear do oócito (MAUD CAILLAUD *et al.*, 2005). Desta forma, sabe-se que a IL-1 β é um fator parácrino que está envolvido na cascata de eventos que levam à ovulação (BEM-SHLOMO *et al.*, 1994) e a maturação oocitária.

Figura 5.

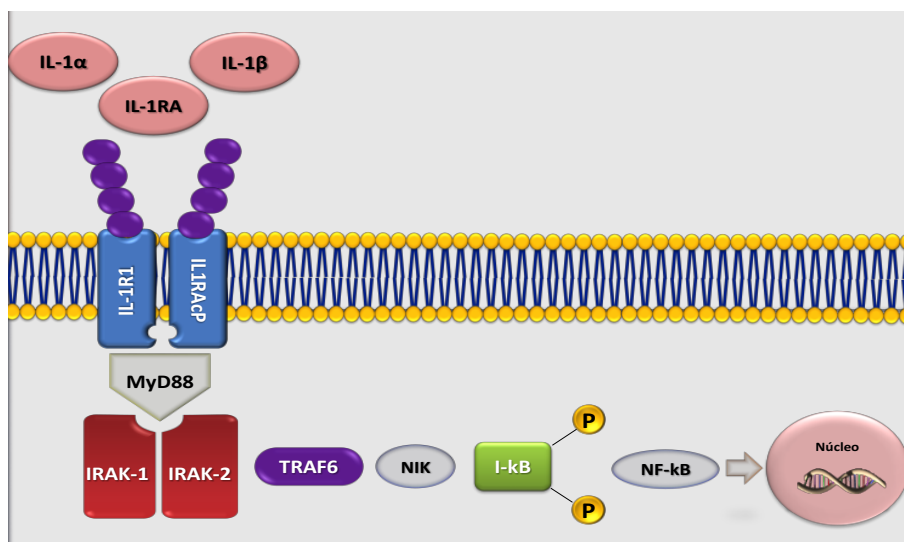


Figura 5. Via de Sinalização da Interleucina 1 (IL-1), mostrando as moléculas que estão envolvidas na cascata de sinalização. Interleucina 1 (IL-1), receptor de interleucina 1 (IL-1RI), receptor acessório da proteína da interleucina 1 (IL-1RAcP), proteína de diferenciação mieloide (MyD88), quinases associadas ao receptor de interleucina 1 (IRAKs), fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), proteína quinase NF-kB indutoras de quinase (NIK), NF-kB inibidor de proteínas (I-kB), fator de transcrição nuclear (NF-kB). Adaptado de GREENFEDER *et al.*, 1995

Em muitos tipos de células, o tratamento com IL-1 β aumenta a síntese do óxido nítrico (NO), que, por sua vez, ativa guanilato ciclasas solúveis (SCHMIDT *et al.*, 1994). No cultivo de folículos pré-ovulatórios, o tratamento com IL-1 β aumenta a produção de NO e inibe a apoptose do folículo de maneira dose dependente (CHUN *et al.*, 1995). Em adição, a IL-1 β tem

sido evidenciada a participar na indução da ovulação, facilitando a ruptura folicular (VASSILIADIS *et al.*, 2005). Foi demonstrado ainda que a IL-1 β também suprime a apoptose em folículos antrais iniciais (CHUN *et al.*, 1996). Acredita-se que a IL-1 β exerce sua ação através de receptores presentes nas células da teca (HURWITZ *et al.*, 1991).

Com relação a expressão do sistema interleucina em ovários bovinos, Passos *et al.* (2016) demonstraram que as proteínas para o sistema IL-1 (IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII) estão presentes nos diferentes compartimentos foliculares em todas as fases do desenvolvimento folicular. Em geral, os oócitos e as células da granulosa de folículos pré-antrais expressam as proteínas para IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII. Já nos folículos antrais, as células da teca também expressam os membros do sistema interleucina (Passos *et al.*, 2016). A tabela 2 ilustra detalhadamente a expressão do sistema interleucina em folículos pré-antrais bovinos.

Tabela 2. Intensidade da expressão de IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI and IL-1RII e localização do mRNA para IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-1RI e IL-1RII em ovários bovinos.

Estrutura	IL-1 α		IL-1 β		IL-1RA		IL-1RI		IL-1RII	
	mRNA	Proteína	mRNA	Protein	mRNA	Proteína	mRNA	Proteína	mRNA	
Folículo primordial										
Oocito	◇	+	◇	-	◇	+	◇	+	◇	
Granulosa	◇	+	◇	+/-	◇	+	◇	+/-	◇	
Folículo primário										
Oocito	◇	+	◇	-	◇	+	◇	+	◇	
Granulosa	◇	++	◇	+/-	◇	+	◇	++	◇	
Folículo Secundário										
Oocito	#	++	#	++	#	++	#	+	#	
Granulosa	#	+++	#	++	#	++	#	+	#	
Teca	#	-	#	-	#	-	#	-	#	

#Folículos inteiros; * Parede folicular. ◇ Não foi avaliado

(-) ausente; (+/-); ocasionalmente encontrado; (+) imunorreação fraca, (++) moderada ou (+++) forte

Fonte: Adaptado de Passos (2016)

No cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos, a presença de 10 e 50 ng/mL de IL-1 β resultou em um aumento significativo na porcentagem de folículos em desenvolvimento e influenciou positivamente a viabilidade folicular durante o cultivo de tecido ovariano (Passos *et al.*, 2016).

2.7. Crescimento oocitário e estoque de RNAs mensageiros

Durante o crescimento folicular em direção a formação dos folículos pré-ovulatórios são observados importantes eventos nos oócitos. Dentre estes eventos podemos citar o acúmulo de RNAs e proteínas que serão utilizados durante as fases finais de maturação oocitária e durante o desenvolvimento embrionário inicial. Dentre os RNAs que são estocados no oócito, pode-se citar *GDF-9*, *H1foo*, *Ciclina B1* e *C-MOS*.

2.7.1. *GDF-9* e membros da família *SMAD*

O *GDF-9* é um importante regulador do desenvolvimento folicular e oocitário (DONG *et al.*, 1996). A expressão do RNAm para *GDF-9* já foi demonstrada em oócitos de bovinos (PENNETIER *et al.* 2004). Nesta espécie, o *GDF-9* estimula a proliferação de células da granulosa (SPICER *et al.* 2006) e da teca (SPICER *et al.* 2008) de pequenos (3-6 mm) e grandes (8-22 mm) folículos antrais. Além disso, estimula o crescimento de folículos pré-antrais, promove a formação da cavidade antral e aumenta a expressão de RNAm para versican e perlecan em folículos cultivados *in vitro* (VASCONCELOS *et al.*, 2012). Em caprinos, o *GDF-9* mantém a sobrevivência de folículos pré-antrais e promove a ativação de folículos primordiais. Além disso, estimula a transição de folículos primários para secundários, mantendo a ultraestrutura e integridade folicular (MARTINS *et al.*, 2008). A atividade do *GDF-9* é mediada por receptores do tipo 1 (Activin Receptor-like Kinase Type 5 - ALK-5), (MAZERBOURG *et al.* 2004) e 2 (BMPRII, VITT *et al.* 2002). Estes receptores ativam as SMADs e outros mensageiros intracelulares, regulando assim a transcrição gênica (SCHMIERER e HILL, 2007). Durante o estoque dos RNAs, a proteína de ligação ao elemento de poliadenilação citoplasmática (CPEB) interage com os RNAs mensageiros, incluindo os que codificam o fator de crescimento e diferenciação-9 (*GDF-9*) e membros da família *SMAD* (PAN *et al.*, 2005). A poliadenilação citoplasmática, desencadeada pela CPEB, é um importante evento que permite que o RNAs possam ser estocados para utilização futura (PAN *et al.*, 2005).

As Smad-1 e Smad-5, que são mensageiros intracelulares da via de sinalização dos fatores da família TGF- β , são especialmente abundantes em oócitos de folículos primordiais, primários e secundários (RACKI, RICHTER, 2006). Os receptores das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) dos tipos 2, 4, 6, 7 e 15 fosforilam as SMAD-1, SMAD-5, SMAD-8 e receptores regulados (R-SMADs). Uma vez fosforilados, os R-SMADs formam um complexo heterotrimérico transcricional, com um SMAD corregulador, a SMAD-4, que se transloca ao núcleo e atua como fator de transcrição ligando-se de forma direta a sítios de ligação específicos nos promotores dos genes-alvo (OHTA *et al.*, 2008; MIYAZONO *et al.*, 2010), ou a outros fatores de transcrição (LEMBONG *et al.*, 2008), ativando ou inibindo a expressão de um gene (MASSAGUÉ *et al.*, 2005). Em camundongos, as proteínas SMAD1/5/8 fosforiladas foram detectadas em oócitos e células de granulosa em todas as fases do desenvolvimento folicular, incluindo folículos primordiais (TANWAR e MCFARLANE, 2011).

2.7.2. Membro O da família das Histonas H1, específica para oócitos (H1foo)

A CPEB também interage com o H1foo (TANAKA *et al.*, 2005), que é abundante em oócitos de folículos primários até o estágio de folículos antrais (RACKI e RICHTER, 2006). As histonas estão envolvidas na formação dos cromossomos, ou seja, as histonas H2A, H2B, H3 e H4 forma o nucleossoma que é envolvido pelo DNA, formando assim a cromatina. Os membros da família das histonas H1 interagem com os nucleossomas possibilitando uma melhor organização da cromatina (MCGRAW *et al.*, 2006). A expressão da H1foo já foi identificada em oócitos bovinos (MCGRAW *et al.*, 2006) e estudos recentes demonstraram que H1foo é essencial para a maturação oocitária (bovinos: YUN *et al.*, 2015). Em camundongos, a H1foo está localizada no núcleo dos oócitos e controla os níveis de expressão gênica e as modificações que ocorrem na cromatina durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (FURUYA *et al.*, 2007). Estes autores demonstraram que após o bloqueio de H1foo *in vitro*, as taxas de maturação oocitária são reduzidas significativamente.

2.7.3 Ciclina B1

Durante a maturação oocitária, a CPEB, através de ondas sequenciais de poliadenilação citoplasmática, regula as atividades fator promotor da maturação (MPF). O MPF é um heterodímero formado pela ciclina B e cinase Cdc2. A Ciclina-B, por meio da formação do MPF, é uma das principais reguladoras das alterações que ocorrem durante a maturação

oocitária, regulando a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, a reorganização dos microtúbulos e outras organelas citoplasmáticas (KRISCHEK e MEINECKE, 2002; LEFEBVRE *et al.*, 2002). A ativação do MPF é também um ponto chave da retomada da meiose em oócitos (EPPIG *et al.*, 1996). Em bovinos, a atividade do MPF requer tanto a neossíntese proteica como as cascatas de fosforilação/desfosforilação. A estabilidade da atividade do MPF pode ser prevenida por drogas que agem nesses dois níveis (MERMILLOD *et al.*, 2000). A variação da atividade do MPF pode ser detectada nos oócitos bovinos durante a maturação. Sua atividade é baixa no estágio de vesícula germinativa (GV), passando a ter níveis menores no início da GVBD. Ela alcança um pico na meiose 1 (M1), declina sua atividade durante a transição entre os estágios de M1 e M2 (KUBELKA *et al.*, 2000) e eleva-se novamente para a entrada do oócito em M2. Sua inativação nos oócitos em estágio de M2 é induzida pela fecundação ou pela ativação paternogenética (KIKUCHI *et al.*, 2000; KUBELKA *et al.*, 2000; ABRIEU *et al.*, 2001; LEDAN *et al.*, 2001). O processo de desorganização do heterodímero do complexo MPF independe da sua ativação catalítica, que é causada geralmente pela proteólise da ciclina B. Em oócitos fecundados de camundongos e de suínos, a degradação da ciclina B foi claramente relacionada com a inativação do complexo MPF (KIKUCHI *et al.*, 2000).

2.7.4. *Quinase C-MOS*

O produto do proto-oncogene C-MOS (quinase C-MOS) é um dos principais fatores que estabiliza e mantém a atividade do MPF. O RNAm para C-MOS é alvo de ligação da CPEB e já foi detectado em oócitos plenamente desenvolvidos (MUTTER, WOLGEMUTH, 1987; IWAOKI *et al.*, 1993), inclusive na espécie bovina (WU *et al.*, 1997). A quinase C-MOS desempenha um papel crucial no controle meiose em oócitos, sua ação ocorre através de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e regula a sobrevivência ou apoptose celular (JALOCHA *et al.*, 2010). Além disso, o bloqueio da atividade de C-MOS durante a maturação de oócitos de camundongos bloqueia a formação do primeiro corpúsculo polar (ZHAO *et al.*, 1991a). Quando a sua ação foi bloqueada em zigotos, observou-se a interrupção da primeira clivagem (ZHAO *et al.*, 1991b). Estes dados indicam que C-MOS é necessário tanto para a ativação do MPF durante as meioses 1 e 2 como para o desenvolvimento embrionário inicial (ZHAO *et al.*, 1991ab).

3. JUSTIFICATIVA

Muitos fatores de crescimento são produzidos no ovário e estão envolvidos no controle do crescimento oocitário e na multiplicação das células da granulosa em animais de laboratório. Contudo, em bovinos, as funções biológicas das citocinas (TNF- α e IL-1 β) durante a foliculogênese ainda não foram totalmente elucidadas. O estudo dos efeitos destas citocinas durante o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais e antrais iniciais é de grande importância tanto para a pesquisa fundamental, como para a reprodução animal. No tocante à pesquisa fundamental, poderá contribuir para elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese inicial. Nesse caso, os folículos isolados do ambiente ovariano, bem como da influência endócrina e nutricional comum ao organismo animal, poderão ser cultivados *in vitro* na presença de TNF- α e IL- 1 β cujo efeito individual ou associado poderá ser avaliado e controlado. Além disso, poderá ser avaliado os níveis de RNAs mensageiros para GDF-9, histona H1foo, ciclina B1 e quinase C-MOS que são normalmente estocados nos oócitos para serem traduzidos durante a maturação nuclear e o desenvolvimento embrionário inicial. Referente à reprodução animal, o resgate de milhares de folículos a partir de um ovário e o posterior cultivo *in vitro* para se obter a maturação dos oócitos poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em via de extinção. Essa demanda poderia ser alcançada através da produção de um grande número de embriões oriundos de um mesmo animal. A execução desta proposta contribuirá, ainda, para o aperfeiçoamento de biotécnicas aplicadas à reprodução animal, como por exemplo, o cultivo *in vitro* de oócitos imaturos, bem como a fecundação e produção *in vitro* de embriões bovinos.

4. HIPÓTESES

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

- ✓ O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais por 18 dias em meio contendo TNF- α e IL-1 β mantém a viabilidade e promove o desenvolvimento de folículos secundários bovinos.

- ✓ O TNF- α e IL-1 β aumentam dos níveis de RNA mensageiros para os genes GDF9, C-MOS, H1foo e Ciclina B1 durante o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de TNF- α (10 ng/mL) e IL- 1 β (10 ng/mL) sobre a viabilidade e o crescimento de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro* por 18 dias.

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a capacidade do TNF- α ou IL- 1 β de promover o crescimento, a formação de antro e manter a viabilidade de folículos secundários *in vitro* durante 18 dias de cultivo.
- ✓ Verificar a capacidade do TNF- α ou IL- 1 β de preservar a ultraestrutura de oócitos e células da granulosa de folículos secundários após o cultivo *in vitro* de 18 dias.
- ✓ Quantificar os níveis de RNA mensageiros para os genes GDF-9, C-MOS, H1foo e Ciclina B1 em folículos secundários cultivados *in vitro* na presença de TNF- α , IL- 1 β ou ambos por 18 dias.

6. ARTIGO I

Effect of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) on in vitro development of isolated bovine secondary follicles

Effect of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) on in vitro development of isolated bovine secondary follicles

Paulino, L.R.F.M¹, Cunha, E.V¹, Silva, A.W.B¹, Souza, G.B¹, Lopes, E.P.F¹, Donato, M.A.M², Peixoto, C. A. ², Silva, J.R.V^{1,4}

¹Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

²Laboratory of Ultrastructure, Federal University of Pernambuco, CPqAM/FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil.

⁴Corresponding author: J.R.V. Silva: Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36118000 [jrvsilva@ufc.br]

Abstract

The objective of the present study was to determine the effect of TNF- α and IL-1 β on development and survival of isolated bovine secondary follicles after 18 days of culture in vitro. Secondary follicles (~0.2 mm) were isolated from ovarian cortex of cows and individually cultured. The secondary follicles were randomly distributed in the following treatments: (I) TCM-199⁺ alone (culture control), or supplemented with (II) 10 ng/mL IL-1 β , (III) 10 ng/mL TNF- α and (IV) both TNF- α and IL-1 β . The follicles were cultured at 38.5°C, with 5% CO₂ in air, for 18 days. Thereafter, the effect of these treatments on growth, follicular survival, antrum formation, viability, ultrastructure and mRNA levels for GDF9, C-MOS, H1foo and Cyclin B1 were then evaluated. At the end of 18 days of in vitro culture, TNF- α increased follicular diameter and the rate of antrum formation. On the other hand, IL-1 β and both IL-1 β and TNF- α did not influence follicle growth. All treatments maintained viability rates after 18 days of culture between 74.32 and 92.00%. Ultrastructural analysis of showed that follicles cultured in

the presence of TNF- α had oocyte cytoplasm and granulosa cells well preserved. The presence of TNF- α , IL-1 β or both did not influence the expression of mRNAs for GDF9, C-MOS, H1foo and Cyclin B1 after 18 days of culture. In conclusion, TNF- α promotes follicular growth and maintains the ultrastructure of isolated bovine secondary follicles cultured in vitro.

Key words: Cow, Ovary, Preantral, Culture, Ultrastructure

1. Introduction

It is well known that, throughout folliculogenesis, the large majority of the oocytes is naturally lost by atresia. Therefore, the availability of oocytes is a limiting factor for the development of new reproductive techniques (SMITZ; CORTVRINDT, 2002). The current methods for the in vitro production of embryos depend on a scarce supply of competent oocytes from large antral or preovulatory follicles, which are present in the ovary in a reduced number (TELFER, 1998). In this way, culturing early preantral follicles is an alternative, since these follicles are found in greater quantity in the ovary, besides being less susceptible to atresia. In the bovine species (GUTIERREZ *et al.*, 2000; McCAFFERY *et al.*, 2000), isolated preantral follicles were developed in vitro until the antral stage. Despite of this advance, a culture protocol guaranteeing complete follicle growth and oocyte maturation in vitro is not yet available. In this sense, it becomes evident the great importance of testing the effects of hormones and growth factors on the development of preantral follicles in vitro.

Cytokines are produced in different organs and act as intracellular messengers, modulating cell growth and hormone production (Baur *et al.*, 2000, Gérard *et al.*, 2004). The production of cytokines in the ovary and their influence on some ovarian processes suggests that cytokines could be important autocrine, paracrine or endocrine regulators of ovarian

function (Sirotkin, 2011; Smolikova *et al.*, 2012; Passos *et al.*, 2016). Ovarian follicles represent a local of synthesis and action of cytokines, like tumor necrosis factor TNF- α (Brännström *et al.*, 1994) and interleukin-1 beta (IL-1 β) (Passos *et al.*, 2016). These peptides directly affect the secretory function of theca cells and or granulosa cells (Roby *et al.*, 1990). There are two main functional receptors that are required for TNF- α to carry out their functions in the ovary, i.e., TNF- α receptor type I (TNFRI) and TNF- α receptor type II (TNFRII). Type 1 TNF- α receptor (TNFR1), which contains intracellular death domain, which is required for cell signaling associated with apoptotic processes. In addition, TNF- α receptor type 2 (TNFR2), can induce gene transcription associated with cell survival, growth and differentiation (WAJANT, PFIZENMAIER, SCHEURICH, 2003).

IL-1 β is a paracrine factor that is involved in the cascade of events that lead to follicular rupture, facilitating ovulation (Ben-Shlomo *et al.*, 1994 and Vassiliadis *et al.*, 2005). Interleukin 1 system has two bioactive ligands, IL-1 α and IL-1 β (Sims *et al.*, 1994 and Dinarello *et al.*, 1993), and its biological activity is mediated through two receptors, IL-1RI (Dower *et al.*, 1995) and IL-1RII (McMahan *et al.*, 1991), as well as a receptor antagonist (IL-1ra), which have competitive action with receptors (Arend *et al.*, 1991). Only IL-1RI can mediate IL-1 signal (Jensen *et al.*, 2000). It is essential for signaling of IL-1Ra its association with the complex IL-1RI (Korherr *et al.*, 1997 and Arend *et al.*, 2008) this occurs when IL-1 binds to IL-1RI, promoting a conformational change in the receptor, allowing IL-1Ra association of IL-1-IL-1RI complex (Casadio *et al.*, 2001). It is known that these receptors and ligands are expressed in bovine ovarian follicles and a recent study reported that IL-1 β promotes the activation of primordial follicles and follicular development in vitro (Passos, *et al.*, 2016). However, there is a lack of studies evaluating the role of TNF- α and IL-1 β on secondary follicles cultured in vitro.

During the growth of oocytes enclosed in ovarian follicles there is accumulation of mRNAs and proteins that have important role during oocyte maturation and early embryo development. Among them, GDF-9 has a key role during follicle development and maturation (Carabatsos *et al.* 1998). During follicular growth in vitro, the mRNA levels of this growth factor is an important marker of oocyte quality. Furthermore, expression of genes, such as C-MOS (MUTTER e WOLGEMUTH, 1987; IWAOKI *et al.*, 1993), H1foo (RACKI e RICHTER, 2006) and Cyclin B1 (KRISCHEK e MEINECKE, 2002; LEFEBVRE *et al.*, 2002) is essential for the oocyte to achieve their competence to be matured in vitro. Despite these factors are considered important markers for oocyte competence, it is unknown if their expression is influenced by TNF- α and IL-1 β during culture of secondary follicles.

The aim of this study was to evaluate the effects TNF- α and IL-1 β on development and survival of isolated bovine secondary follicles after 18 days of culture. In addition, the influence of TNF- α and IL-1 β on mRNA expression of GDF-9, C-MOS, H1foo and CyclinB1 in cultured secondary follicles was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The culture media and other chemicals used in the present study they were bought from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) unless otherwise indicated in the text.

2.2. Source of ovaries

Bovine ovaries (n=20) were collected from a local slaughterhouse immediately after slaughter. After gathering, the ovaries were washed in 70% ethanol for about 10 sec, followed by two rinses in TCM199 buffered with HEPES and supplemented with penicillin (100 mg/ml) and streptomycin (100 mg/ml). Later, the ovaries were transported within 1h to the laboratory in TCM-199 at 4°C (Chaves *et al.* , 2008).

2.3. Follicle isolation and in vitro culture

In the laboratory, the ovaries were subjected to fragmentation of the ovarian cortex (1-2mm) with the help of a sterile scalpel blade and placed in TCM-199 medium supplemented with HEPES. Secondary follicles, with approximately 200 μm in diameter, were identified under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually dissected from the strips of the ovarian cortex using 26-gauge needles. After isolation, the follicles were transferred to 100 μl drops of fresh fragmentation medium under mineral oil to further evaluate their quality. Follicles with a visible oocyte surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane, and no antral cavity were selected for culture. Then, follicles were individually cultured in 100 μL of culture medium under mineral oil in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). The control culture medium, called TCM-199⁺, consisted of TCM-199 (pH 7.2-7.4) supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin and 5 ng/mL selenium (ITS), 3.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ascorbic acid and 100 ng/mL FSH). The secondary follicles were randomly distributed over the following treatments: (I) TCM-199⁺ alone (culture control), or supplemented with (II) (10 ng/mL) IL-1 β , (III) (10 ng/mL) TNF- α and (IV) and both IL-1 β and TNF- α . The follicles were cultured at 38.5°C, with 5% CO₂ in air, for 18 days. Every two days of culture, 60 μL of medium was replaced by fresh medium.

2.4. Morphological evaluation of cultured follicles

Follicles were morphologically evaluated with the aid of stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan), and morphologically normal follicles had a spherical oocyte surrounded by cumulus cells, which was limited by an intact basement membrane and estracal-thecal outer layer, respectively. Follicles with an opaque and/or extruded oocyte and opaque granulosa cells

were considered degenerated. On days 0, 6, 12 and 18, the percentage of morphologically normal follicles was assessed. In addition, two perpendicular measurements were performed in the normal follicles using an inverted microscope with NIS Elements 2.4 software, (Nikon, Nikon Instruments Inc., Japan).

2.5. Assessment of preantral follicle viability by fluorescence microscopy

To confirm the results of the morphological analyses, the viability of follicles cultured in all treatments was further analyzed using a more accurate method of assessment based on fluorescent probes. After culture, follicles (n=20/treatment) were incubated in 100 μ L droplets of TCM-199 containing 4mM calcein-AM and 2mM ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37°C for 15 min. Afterwards, the follicles were washed three times in TCM-199 and examined under fluorescence microscope (Nikon, Eclipse, TS 100.,m Japan). Oocytes and granulosa cells were considered to be viable if the cytoplasm was stained positively with calcein-AM (green) and if the chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red) (Schotanus *et al.*, 1995; Van den Hurk *et al.*, 1998).

2.6. Expression of mRNA for GDF9, C-MOS, H1foo and Cyclin B1in bovine secondary follicles

Morphologically normal follicles that have been cultured in each treatment were collected and then stored at -80°C until extraction of total RNA. Total RNA extraction was performed using a Trizol® purification kit (In vitrogen, São Paulo, Brazil). In accordance with the manufacturer's instructions, 800 μ L of Trizol solution was added to each frozen sample and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at 10,000 g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using

RNase free DNase (340 Kunitz units/ml) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30 μ L RNase-free water. The RNA concentration was estimated by Reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 280nm in a spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, UK) and 2 μ L of total RNA was used for reverse transcription. Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70°C and then cooled in ice. Reverse transcription was performed in a total volume of 20 μ L, which was comprised of 10 μ L of sample RNA, 4 μ L 5 \times reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units RNase out, 150 units Super script III reverse transcriptase, 0.036 U random primers (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM DTT, and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for 1 h at 42°C, for 5 min at 80°C, and then stored at -20°C. Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 μ L cDNA as a template in 7.5 μ L of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 μ L of ultra-pure water, and 0.5 μ M of each primer. The primers were designed by using the Primer Quest SM program (<http://www.idtdna.com>) to perform amplification of GDF9, C-MOS, H1foo, CyclinB1 and housekeeping gene Ubiquitin (UBQ) (Table 1). These housekeeping genes have shown highest stability in bovine preantral follicles (Rebouças *et al.*, 2012) and, thus, was used to normalize expression of target genes. The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The efficiency of amplification for all genes was verified according to Pfaffl *et al.* (2001). 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 s at 95°C, 30 s at 58°C, and 30 s at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a real-time PCR Real plex (Eppendorf, Germany). The $\Delta\Delta C_t$

method was used to transform the Ct values in to normalized relative expression levels (Livak and Schmittgen, 2001).

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

Target gene	Primer sequence (5'→ 3')	Sense (s), GenBank accession	
		anti-sense (As)	no.
UBQ	GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT	S	NM_001206307
	ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT	As	
GDF9	ACAACACTGTTTCGGCTCTTCACCC	S	GI:51702523
	CCACAACAGTAACACGATCCAGGTT	As	
C-MOS	CTGCAAGATCGGGGACTTCG	S	AY:168496.1
	CTCGGTGAGTGTAGGTGCCA	As	
H1foo	CCCAAGAAGCCGAGTGAGTC	S	NM_001035372.1
	CTTGGTATCTGCTTGGCGGC	As	
Cyclina B1	CTCCAGTGCTCTCCTCCTCACT	S	NM:001045872.1
	CTAATCTTCGTGTTCTGGTGATCC	As	

2.7. Ultrastructural analysis of cultured preantral follicles

In order better evaluate follicular morphology, transmission electron microscopy (TEM) was carry out to analyze the ultrastructure of bovine secondary follicles after in vitro culture. Isolated follicles (n= 6 to 10 per treatment) were fixed in Karnovsky solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for at least 4h at room temperature (approximately 25°C). After fixation, cultured follicles were embedded in drops of 4% low melting agarose, and kept in sodium cacodylate buffer. Specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1h at room temperature, washed in sodium cacodylate buffer and counterstained with 5% uranyl acetate. The samples were then dehydrated through a gradient of acetone solutions and thereafter embedded in epoxy resin

(Epoxy-Embedding Kit, Fluka Chemika-BioChemika). Thereafter, semi-thin sections (2 μm) were cut, stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy at a 400x magnification. Ultra-thin sections (70 nm) were obtained from bovine secondary follicles identified in semi-thin sections. Subsequently, ultra-thin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Morgani-FEI transmission electron microscope.

2.8. Statistical analysis

Data of follicular diameter were subjected to logarithmic transformation ($\log_{10}(x)$) and then, evaluated by ANOVA. The treatments were compared by Student-Newman-Keuls (SNK) test. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M) and differences were considered significant when $P < 0.05$. Data concerning follicular survival and antrum formation after in vitro culture in each treatment were compared by using the Chi-square test, with the results being expressed as percentages. The data of mRNA were analyzed using the Tukey test. Differences were considered significant when $P < 0.05$ and data were expressed as mean \pm standard error of means (S.E.M.)

3. Results

3.1. *Effects of TNF- α and IL-1 β on follicular growth, antrum formation and survival*

A progressive increase ($P < 0.05$) in follicular diameter was observed in all treatments during the culture period (Table 2). After 6 days of culture, the follicles cultured in the presence of both IL-1 β and TNF- α showed a significant increase compared to the other treatments ($P < 0.05$). At day 12, the diameters did not differ among treatments. At the end of culture time (Day 18), the follicles cultured in the presence of both IL-1 β and TNF- α did not differ from those cultured in control medium (TCM-199+). On the other hand, follicles cultured in medium containing TNF- α alone had a significant increase in diameter ($P < 0.05$) compared to cultured control.

Table 2. Diameters (Mean \pm Standard Deviation) of isolated bovine follicles after 0, 6, 12 and 18 days of in vitro culture in TCM 199⁺ alone or supplemented with IL-1 β , TNF- α and both IL-1 β and TNF- α . Significantly different (P<0.05).

Day of culture	TCM 199 ⁺	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β +TNF- α
0	189.71 \pm 16.9 ^{Aa}	189.72 \pm 15.65 ^{Aa}	186.06 \pm 15.45 ^{Aa}	187.97 \pm 18.23 ^{Aa}
6	223.30 \pm 35.27 ^{Ab}	234.60 \pm 35.42 ^{Aa}	226.80 \pm 34.70 ^{Ab}	243.67 \pm 50.30 ^{Bb}
12	267.33 \pm 56.48 ^{Ac}	285.86 \pm 65.38 ^{Ac}	286.48 \pm 80.88 ^{Ac}	297.59 \pm 88.83 ^{Ac}
18	300.00 \pm 74.31 ^{Ad}	297.60 \pm 64.35 ^{Ac}	339.06 \pm 97.03 ^{Bd}	306.44 \pm 89.00 ^{Abc}

A, B, C Uppercase letters represent differences between treatments (on the same day of culture).

a b c Lowercase letters represent statistically significant differences between the culture days (same column).

After 18 days of culture, follicular antrum formation was observed in all treatments, but only follicles cultured in the presence of TNF- α showed a significant increase in the percentage of antrum formation when compared to other treatments at days 6, 12 and 18 (P<0.05) (Table 3).

Table 3. Percentage of antrum formation of secondary follicles cultured for 18 days in TCM-199⁺ or supplemented with IL-1 β and / or TNF- α . Significantly different (P<0.05).

Day of culture	TCM 199 ⁺ (n=64)	IL-1 β (n=64)	TNF- α (n=69)	IL-1 β +TNF- α (n=55)
0	0.00 % (0/64) ^A	0.00 % (0/64) ^A	0.00 % (0/69) ^A	0.00 % (0/55) ^A
6	6.57 % (5/64) ^A	2.73 % (2/64) ^A	24.65 % (18/69) ^B	4.22 % (3/55) ^A
12	8.33 (6/64) % ^A	7.69 % (5/64) ^A	30.98 % (22/69) ^B	8.33 % (5/55) ^A
18	12.5 (8/64) % ^A	10.93 % (7/64) ^A	33.33 % (23/69) ^B	9.09 % (5/55) ^A

Data show the percentage of follicles exhibiting antrum formation, with the number of follicles with an antrum/total number of follicles given in parentheses.

A, B, C Uppercase letters represent differences between treatments (on the same day of culture).

Concerning viability, after 18 days of in vitro culture, follicles cultured in the presence of TNF- α , IL-1 β and both IL-1 β and TNF- α shows viability rate similar to the control. However, follicles cultured with TNF- α had higher rates of viability ($P < 0.05$) when compared with those cultured with IL-1 β and both IL-1 β and TNF- α (Table 4). Morphologically normal follicles after in vitro culture are shown in Figure 1 (A, C, E, G). Viable follicles are stained with calcein-AM (green) and are not stained with ethidium homodimer-1 (red) as shown in Figure 1 (B, D, F and H).

Table 4. Survival of bovine isolated secondary follicles cultured for 18 days in TCM-199⁺ supplemented with TNF- α and / or IL-1 β . Significantly different ($P < 0.05$).

Day of culture	TCM 199 ⁺	IL-1 β	TNF- α	IL-1 β + TNF- α
0	100.00(76/76) ^{Aa}	100.00(79/79) ^{Aa}	100.00(75/75) ^{Aa}	100.00(74/74) ^{Aa}
6	100.00(76/76) ^{Aa}	92.40(73/79) ^{Ba}	97.33(73/75) ^{Aa}	95.94(71/74) ^{Aa}
12	94.73(72/76) ^{Aa}	82.27(65/79) ^{Bb}	94.66(71/75) ^{Aa}	81.08(60/74) ^{Bb}
18	84.21(64/76) ^{ABb}	81.01(64/79) ^{ABb}	92.00(69/75) ^{Aa}	74.32(55/74) ^{ABb}

A, B, C Uppercase letters represent differences between treatments (on the same day of culture). a b c Lowercase letters represent statistically significant differences between the culture days (same column).

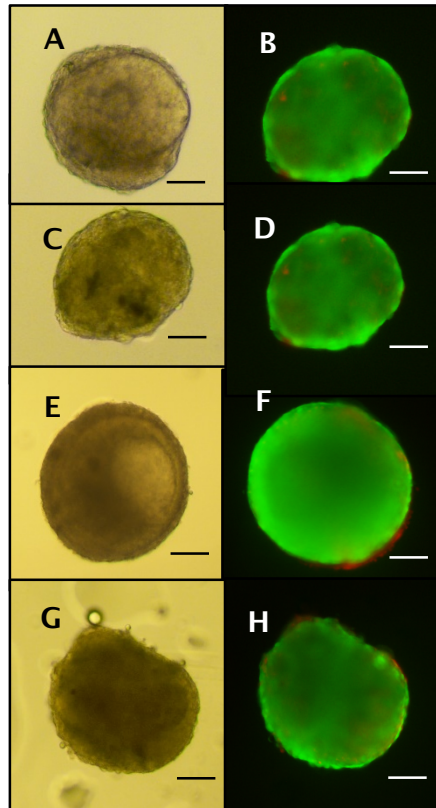


Figure 1. Viable bovine secondary follicles cultured for 18 days evaluated by light microscopy (100x magnification) and after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer-1 (red). Secondary follicle cultured in TCM-199+ alone (A, B) or supplemented with IL- β (C, D), TNF- α (E, F), or both TNF- α and IL- β (G, H). Scale bars represent 100 μ m.

3.2. Influence of TNF- α and IL-1 β on mRNA expression of GDF9, C-MOS, H1foo and Cyclin B1 in cultured secondary follicles

The levels of mRNA for GDF9, C-MOS, H1foo and Cyclin B1 in follicles cultured for 18 days in TCM-199+ alone or supplemented with TNF- α , IL-1 β and both IL-1 β and TNF- α are showed in Fig. 2 (A-F). The presence of TNF- α , IL-1 β and both in culture medium did not influence the levels of mRNA for GDF9, C-MOS, H1foo and Cyclin B1 ($P > 0.05$).

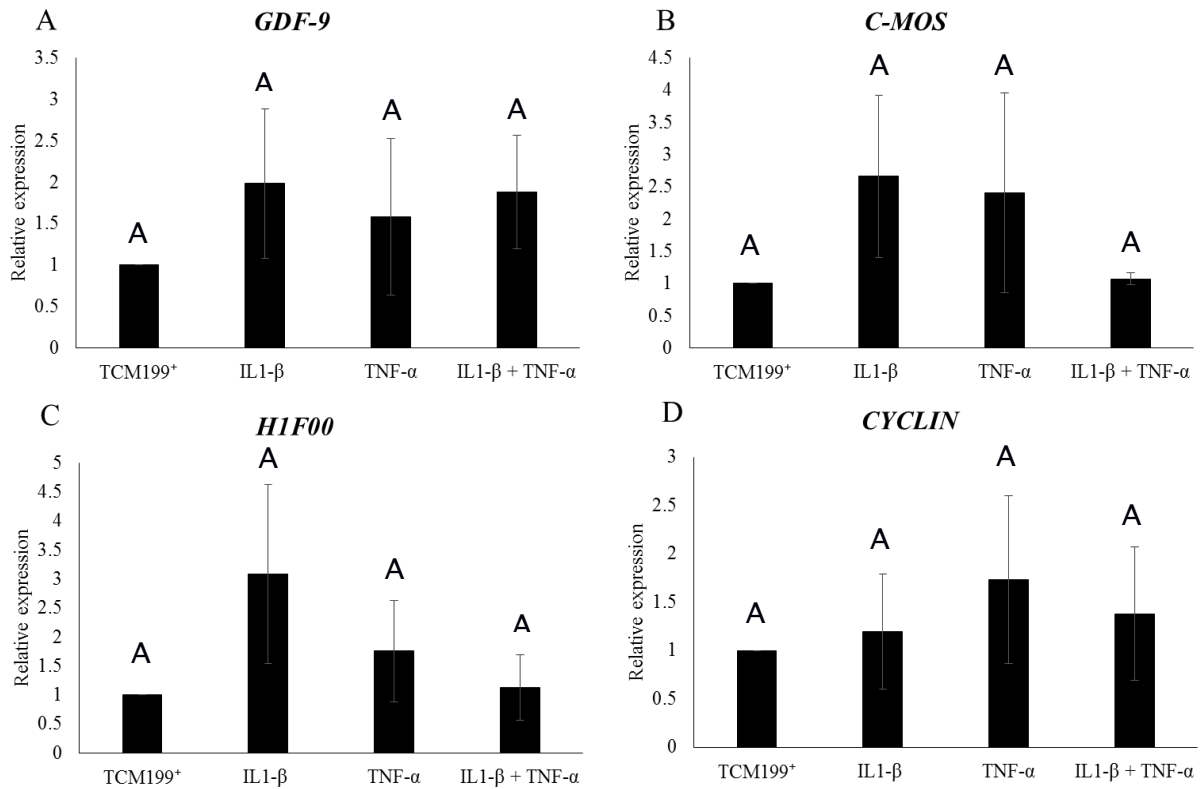


Figure 2. Levels of mRNA for *GDF-9* (A); *C-MOS* (B), *H1F00* (C) and *CYCLIN* (D) in secondary follicles (mean ± SD) cultured in vitro for 18 days. Same uppercase letters (A) represent no significant differences between different treatments ($P > 0.05$)

3. 3. Ultrastructural analysis of cultured secondary follicles

Normal follicles from fresh control had granulosa cells (Fig. 3A) and oocytes (Fig. 3B) with mitochondria with normal cristae. The organelles were uniformly distributed in the oocytes and vacuoles were minimally observed. In follicles cultured in control group (TCM-199⁺), signals of degeneration such as a lack of functional organelles and vacuolization, multivesicular bodies in the ooplasm (Fig. 3D) of the cultured oocytes were observed. In the granulosa cells (3C), it was not possible to observe significant changes comparing to control group.

Follicles cultured in medium supplemented with IL-1β showed granulosa cells with preserved ultrastructure (Fig. 3E), but vacuolization associated with low density of cytoplasmic

organelles were seen in the oocyte, (Fig. 3F). The ultrastructural characteristics observed in the follicles cultured with TNF- α alone showed conserved granulosa cells and nucleus, as well as intact plasmatic and nuclear membranes (Fig. 3G). Oocyte and granulosa cells were well connected and visible organelles were observed in ooplasm (Fig. 3H). Follicles cultured in medium to which both TNF- α and IL-1 β was added had ultrastructurally normal granulosa cells (Fig. 3I) and a oocyte with disorganized ooplasm (Fig. 3J).

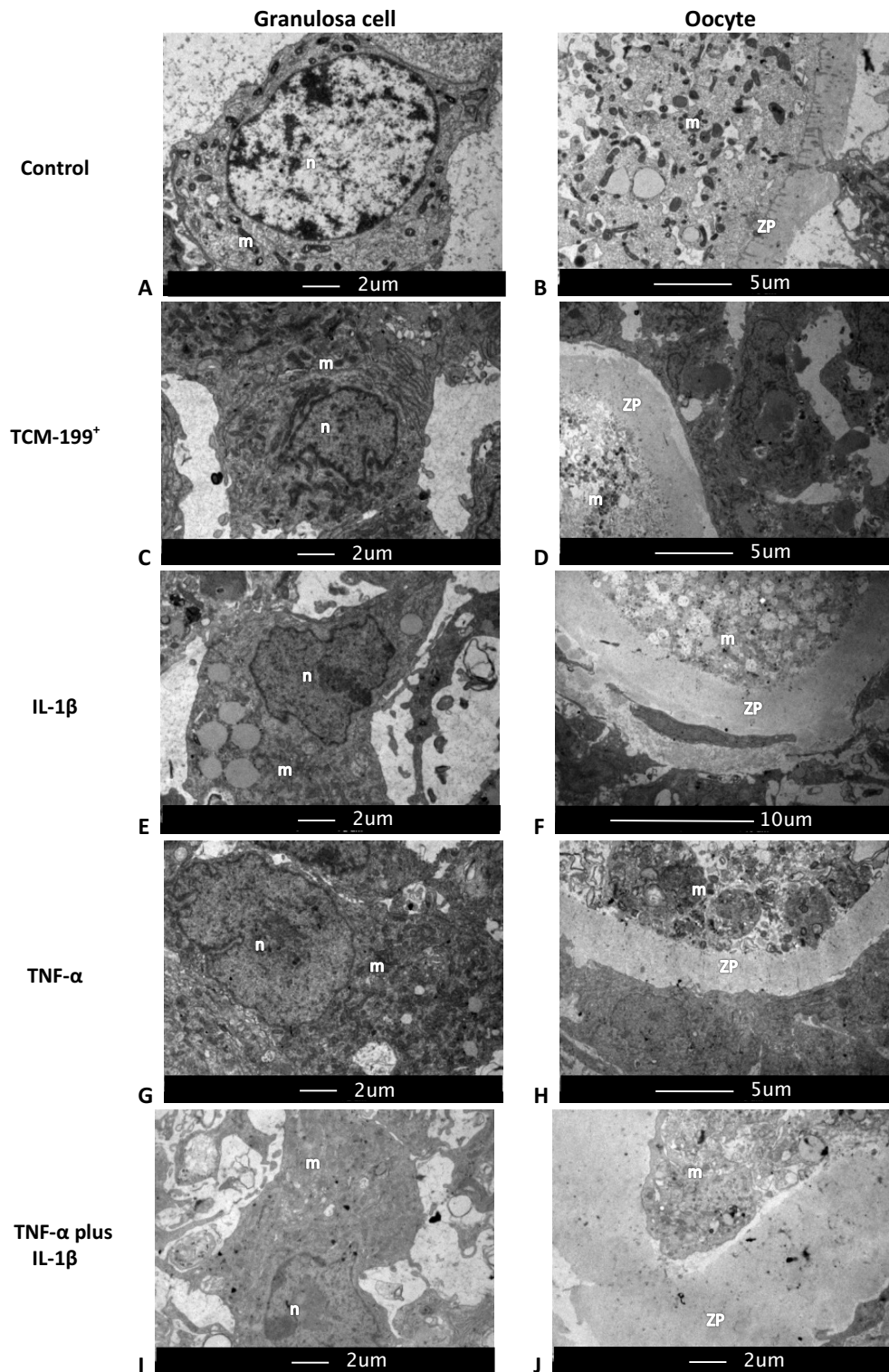


Figure 3. Representative micrographs of cultured secondary follicles from bovine after 18 days of culture in the presence of IL-1 β , TNF- α alone or both. Follicles from fresh control (A-B) or cultured TCM-199⁺ alone (C-D), or supplemented with IL-1 β ,

(E-F) TNF- α (G-H), or both IL-1 β and TNF- α (I-J). Bars= 2,5 and 10 μ m. ZP: zona pellucida; m: mitochondria; n: nucleus.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this study constitutes the first report to demonstrate the beneficial effect of TNF- α on the in vitro culture of isolated bovine secondary follicles. In this work, we observed that TNF- α promotes the growth, antrum formation and maintains the ultrastructure of secondary follicles cultured in vitro for 18 days, while IL-1 β hampered the follicular survival and the ability to grow in vitro .

The ability of TNF- α to promote the increase in follicular diameter is due to the fact that there is a presence of specific receptors in the surface of follicular somatic cells. According to Silva *et al.* (2016), TNF- α and its receptors (TNFR1 and TNFR2) are present in bovine follicular cells. This fact suggests that the exogenous TNF- α added in the culture medium binds to the TNFR2 and promotes follicular growth. As reported by WAJANT, PFIZENMAIER, SCHEURICH (2003), TNFR2 can induce gene transcription associated with cell survival, growth and differentiation. Fisher *et al.* (2011) demonstrated that TNFR2 is involved in tissue regeneration and neuroprotection. These authors showed that protection from cell death is dependent on TNFR2 activation of the PI3K-PKB/Akt pathway. Recently, Dong *et al.* (2016) also highlighted the essential protective role of TNFR2 in cells from the central nervous system. TNF- α has also been shown to activate NF- κ B, which in turn regulates the expression of proteins associated with cell survival and cell proliferation (Aggarwal *et al.*, 2004). TNF- α can also activate cellular proliferation through activation of another transcription factor, the activator protein-1 (AP-1) (Natoli *et al.*, 2000), which is activated by TNF- α through sequential recruitment of TNFR1, TRADD, TRAF2, MAP/ERK kinase kinase 1 (MEKK1), MAP kinase kinase 7 (MKK7), and JNK (Ermolaeva *et al.*, 2008).

In this study, secondary follicles cultured in the presence of IL-1 β alone or in association with TNF- α did not showed significant difference in growth when compared to control group. Probably, IL-1 β acts mainly in large antral follicles. Previously, it was shown that IL-1 modulates rat (Karakji *et al.*, 1995) and bovine (Baratta *et al.*, 1996) granulosa cell proliferation in vitro, dependent on the follicle size. It inhibits steroidogenesis in bovine undifferentiated follicles, but stimulates the release of progesterone in differentiated follicles (Baratta *et al.*, 1996; Bornstein *et al.*, 2004). The interaction of IL-1 β and TNF- α did not influence the follicular growth. In this way, we suggest that the presence of IL-1 β may acts regulating the follicular development by reducing the follicle-stimulating hormone binding capacity of granulosa cells.

The ultrastructural analysis shows that TNF- α maintained follicular integrity, while the association of TNF- α with IL-1 β was not able to maintain the ultrastructure of the follicles after in vitro culture. A study in mice revealed that IL-1 β emerges as an important participant in the depletion of ovarian reserve associated with age in mice, possibly improving the expression of inflammatory genes and promoting apoptotic pathways (Uri-Belapolsky S, *et al.*, 2014) justifying a possible blockade of TNF- α action on the development of follicles. In a recent study, it was confirmed the ultrastructural integrity of bovine COCs cultured in presence of TNF- α (Silva *et al.*, 2016), emphasizing that TNF- α is probably not acting via TNFR1, which contains an intracellular death domain that triggers signaling pathways associated with apoptosis (Boldin *et al.*, 1995). Thus, it is possible that TNF- α acts in an paracrine/autocrine manner in follicular cells to regulate cellular differentiation and proliferation.

The levels of mRNAs that are stored in the oocytes (*GDF-9*, *C-MOS*, *H1FO0* and *CYCLIN*) to be translated during oocyte maturation and early embryo development were not influenced by TNF- α or IL-1 β alone or in association. Since various hormones and growth factors regulates follicle development and oocyte growth (Silva et al., 2016), probably other factors different from TNF- α or IL-1 β regulates the levels of these transcripts.

In conclusion, TNF- α (10 ng/ml) promotes increase in the diameter of secondary follicles after 18 days of culture in vitro. In addition, it is capable of promoting the maintenance of follicular viability after culture. In the other hand, IL-1 β does not have additive effect on the development of isolated bovine secondary follicles cultured for 18 days.

Financial Support

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). J.R.V. Silva is an investigator for CNPq. L.R.F.M Paulino is the recipient of a MSc scholarship from The Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES), Brazil.

Statement of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Aggarwal, B.B.; Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, v. 6, n. 3, p. 203-208, 2004.
- Arend, W.P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 88, n. 5, p. 1445–51, 1991.
- Arend, W.P.; Palmer, G.; Gabay, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews*, v. 223, p. 20–38, 2008.
- Baratta, M.; Basini, G.; Bussolati, S.; Tamanini, C. Effects of interleukin-1 beta fragment (163-171) on progesterone and estradiol-17 beta release by bovine granulosa cells from different size follicles. *Biol Reprod*, v. 50, n. 4, p. 977, 1994.
- Baur, A.; Bauer, K.; Jarry, H.; Köhrle, J. Effects of proinflammatory cytokines on anterior pituitary 5'-deiodinase type I and type II. *Journal of Endocrinology*, v. 167, n. 3, p. 505-515, 2000.
- Ben-Shlomo, I.; Adashi, E.Y.; Payne, D.W. Themorphogenic/cytotoxic and prostaglandin-stimulating activities of interleukin-1 beta in the rat ovary are nitric oxide independent. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 94, n. 4, p. 1463-1469, 1994.
- Boldin, M. P.; Varfolomeev, E. E.; Pancer, Z.; Mett, I. L.; Camonis, J.H., Wallach, D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*;270:7795e8, 1995.
- Bornstein, S. R.; Rutkowski, H.; Vrezas, I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. v. 27;215, n. 1-2, p. 135-41, 2004
- Brännström, M.; Bonello, N.; Wang, L.J.; Norman, R.J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on ovulation in the rat ovary. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, n. 1, p. 67-73, 1995.
- Carabatsos, M. J.; Elvin, J.; Matzuk, M. M.; Albertini, D.J. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol*. v. 204, p. 373-84, 1998.
- Casadio, R.; Frigimelica, E.; Bossù, P.; Neumann, D.; Martin, M.U.; Tagliabue, A.; Boraschi, D. Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 499, n. 1-2, p. 65-68, 2001.
- Chaves, R. N.; Martins, F. S.; Saraiva, M.V.A.; Celestino, J.J.H.; Lopes, C.A.P.; Correia, J.C.; Lima-Verde, I. B.; Matos, M.H.T.; Bão, S.N.; Name, K.P.O.; Campello, C.C.; Silva, J.R.V.; Figueiredo, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, n. 5, p. 640–647, 2008.
- Cortvrindt RG, Smitz JE. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function. *Hum Reprod Update*. v. 8, p. 243-54, 2002.
- Dinarelli, C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Official Publication of the Federation of America Societies for Experimental of Biology*, v. 8, n. 15, p. 1214-1325, 1993.

Dong Y, Dekens D, De Deyn P, Naudé P, Eisel U. Targeting of tumor necrosis factor alpha receptors as a therapeutic strategy for neurodegenerative disorders. *Antibodies*, p. 4, n. 4, p.369–408, 2015.

Dower, S.K.; Kronheim, S.R.; March, C.J.; Conlon, P.J.; Hopp, T.P.; Gillis, S.; Urdal, D.L. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 162, n. 2, p. 501-515,1995.

Ermolaeva, M. A.; Michallet, M. C.; Papadopoulou, N.Utermöhlen, O.; Kranidioti, K.; Kollias, G.; Tschopp, J.; Pasparakis, M. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nature Immunology*, v. 9, n. 9, p. 1037-1046, 2008.

Fischer R, et al. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. *PLoS One*. v. 6, n. 11, 2011.

Gerard, N.; Caillaud, M.; Martoriati, A.; Goudet, G.; Lalmanach, A. C. The interleukin-1 system and female reproduction. *J. Endocrinol.* v. 180, p. 203–212, 2004.

Gutierrez, C.G; Ralph, J.H.; Telfer, E.E.; Wilmut, I.; Webb, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod.* v. 62, n. 5, p. 1322-8, 2000.

Iwaoki, Y.; Matsuda, H.; Mutter, G. L.; Watrin, F. And Wolgemuth, D. J. Differential expression of the proto-oncogenes c-abl and c-mos in developing mouse germ cells. *Exp. Cell Res.* v. 206, p. 212-219, 1993.

Jensen, L.E.; Muzio, M.; Mantovani, A.; Whitehead, A.S. IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL- 1 receptor accessory protein. *Journal of Immunology*, v. 164, n. 7, p. 5277–5286, 2000.

Karakji, E. G.; Tsang, B. K. Tumor necrosis factor alpha inhibits rat granulosa cell plasminogen activator activity in vitro during follicular development. *Regul Pept.* v. 17;67, n. 3, p. 187-94, 1996.

Korherr, C.; Hofmeister, R.; Wesche, H.; Falk, W. A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. *European Journal of Immunology*, v. 27, n. 1, p. 262–267, 1997.

Krischek, C.; Meinecke, B. In vitro maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. *Anim. Reprod. Sci.* v. 73, p. 129-140, 2002.

Lefebvre, C.; Terret, M.E.; Djiane, A.; Rassinier, P.; Maro, B.; Verlhac, M.H. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol*, v. 157, p. 603–613, 2002.

Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

McCaffery, F.H.; Leask, R.; Riley, S. C.; Telfer, E. E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod.* v. 63, n. 1, p. 267-73, 2000.

McMahan, C.J.; Slack, J.L.; Mosley, B.; Cosman, D.; Lupton, S.D.; Brunton, L.L.; Grubin, C.E.; Wignall, J.M.; Jenkins, N.A.; Brannan, C.I.; Copeland, N.G.; Huebner, K.; Croce, C.M.; Cannizzarro, L.A.; Benjamin, D.; Dower, S.K.; Spriggs, M.K.; Sims, J.E. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *The EMBO Journal*, v. 10, n. 10, 2821-2832, 1991.

Mutter, G. L.; Wolgemuth, D. J. Distinct developmental patterns of c-mos protooncogene expression in female and male mouse germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 84, p. 5301-5305, 1987.

Natoli, G.; Costanzo, A.; Moretti, F.; Fulco, M.; Balsano, C.; Levrero, M. Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2: nuclear factor kappaB (NFkappaB)-inducing kinase requirement for activation of activating protein 1 and NFkappaB but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 42, p. 26079-26082, 1997.

Passos, J. R. S.; Costa, J. J. N.; da 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. Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial follicle activation and survival in vitro. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 54, p. 48–59, 2016.

Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, p. 2003-2007, 2001.

Racki, W. J.; Richter, J. D. C. *peb* controls oocyte growth and follicle development in the mouse. *Development*, v. 133, p. 4527-37, 2006.

Reboucas, E.D., Costa, J.J.D., Passos, M.J., Passos, J.R.D., van den Hurk, R., Silva, J.R.V. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v. 56, p. 143–154, 2013.

Roby, K.F.; Weed, J.; Lyles, R.; Terranova, P.F. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 71, n. 5, p. 1096-1102, 1990.

Schotanus, K.; Holtkamp, G. M.; Van Rooijen, N.; Tilders, F. J.; Berkenbosch, F. Circulating tumor necrosis factor-alpha does not mediate endotoxin-induced hypothermia in rats. *Am J Physiol.* 268(4 Pt 2): p. 989-96, 1995.

Silva J.R, Van den Hurk r, Figueiredo J.R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm. *Domestic Animals Endocrinology*, v. 55, p. 123-35, 2016.

Sims, J.E.; Gayle, M.A.; Slack, J.L.; Alderson, M.R.; Bird, T.A.; Giri, J.G.; Colotta, F.; Re, F.; Mantovani, A.; Shanebeck, K. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, n. 13, 6155-6159, 1994.

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

Smolikova, K.; Mlynarcikova, A.; Scsukova, S. Role of interleukins in the regulation of ovarian functions. *Endocrinology Regulations*, v. 46, n. 4, p. 237-253, p. 2012.

Telfer EE1. In vitro models for oocyte development. *Theriogenology*. p. 15, n. 492, p. 451-60, 1998.

Uri-Belapolsky, S.; Shaish, A.; Eliyahu, E.; Grossman, H.; Levi, M.; Chuderland, D.; Ninio-Many, L.; Hasky, N.; Shashar, D.; Almog, T.; KandelKfir, M.; Harats, D.; Shalgi, R.; Kamari, Y. Interleukin-1 deficiency prolongs ovarian lifespan in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 111, n. 34, p. 12492–7, 2014.

Van Den Hurk, R1; Spek, E. R.; Hage, W. J.; Fair, T.; Ralph, J. H.; Schotanus, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum Reprod Update*. v. 4, n. 6, p. 833-41, 1998.

Vassiliadis, S.; Relakis, K.; Papageorgiou, A.; Athanassakis, I. Endometriosis and infertility: a multi-cytokine imbalance versus ovulation, fertilization and early embryo development. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 12. n. 2, p. 125-129, 2005.

Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. v. 10, n. 1, p. 45-65, 2003.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ O TNF- α (10 ng/mL) promove o crescimento e a formação de antro em folículos secundários cultivados *in vitro* por 18 dias.
- ✓ O cultivo de folículos secundários na presença do TNF- α (10 ng/mL) e IL-1 β (10 ng/mL) mantém a integridade do citoplasma do oócito e das células da granulosa após 18 dias *in vitro*.
- ✓ O TNF- α , a IL-1 β ou ambos não influenciam a expressão de GDF9, C-MOS, H1foo e Cyclina B1 em folículos cultivados *in vitro* por 18 dias.

8. PERSPECTIVAS

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

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIEU, A., DORÉE, M., FISHER, D. The interplay between cyclin-B–Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. **Journal of Cell Science.**, v. 114, p. 257-267, 2001.

ADAMS A. A. Effect of body condition, body weight and adiposity on inflammatory cytokine responses in old horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v. 5, n. 3-4, p. 286-94, 2008.

ADASHI, E. Y. Do cytokines play a role in the regulation of ovarian function. **Prog Neuro Endocrinol Immunology**, v. 3, p. 11-17, 1990a.

ADASHI, E. Y. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of residente ovarian cells of the white blood cell series. **Endocrine Reviews**, v. 11, p. 454 – 464, 1990b.

ADASHI, E. Y.; RESNICK, C. E.; HERNANDEZ, E. R.; HURWITZ, A.; ROSENFELD, R. G. Follicle-stimulating hormone inhibits the constitutive release of insulin-like growth factor binding proteins by cultured rat ovarian granulosa cells. **Endocrinology**, v. 126, n. 2, p. 1305–1307, 1990c.

ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 78, 2014.

AREND, W.P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 1445–1451, 1991.

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.

BARBERINO R. S, BARROS V. R, MENEZES V. G, SANTOS L. P, ARAÚJO V. R, QUEIROZ M. A, ALMEIDA J. R, PALHETA R. C, MATOS M. H. Amburana cearensis leaf extract maintains survival and promotes in vitro development of ovine secondary follicles. **Zygote**. v. 2, p. 277-85, 2016.

BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 537-555, 2006.

BARRETA The components of the angiotensin-(1-7) system are differentially expressed during follicular wave in cattle. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.** v. 16, n. 2, p. 275-83, 2015.

BARROS, V. R. P. et al. Immunolocalization of Melatonin and Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Caprine Ovaries and their effects during in vitro development of isolated pre-antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals.** v. 48, p. 1025-1033, 2013.

BASINI G, MAINARDI G. L, BUSSOLATI S, TAMANINI C. Steroidogenesis, proliferation and apoptosis in bovine granulosa cells: role of tumour necrosis factor- α and its possible signalling mechanisms. **Reproduction Fertility Development**. v. 14, p. 41–150, 2002.

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

BEZERRA, F. T. G.; SILVA, A. W. B.; RISSI, V. B.; ROSA, P. A.; DE CESARO, M. P.; COSTA, J. J. N.; GONÇALVES, P. B. D.; SILVA, J. R. V. Cilostamide and follicular hemi sections inhibit oocyte meiosis resumption and regulate gene expression and cAMP levels in bovine cumulus-oocyte complexes. **Livestock Science**, v. 184, p. 112–118, 2016.

BONNET; DALBIÈS-TRAN; SIRARD. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals, **Reproduction**.v. 135, n. 2, p. 119-28, 2008.

BRANNSTRO, M. M.; BONELLO, N.; WANG, L. J.; NORMAN, R. J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on ovulation in the rat ovary. **Reproduction Fertility**, v. 7, p. 67-73, 1995.

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

BRISTOL-GOULD, S. K.; KREEGER, P. K.; SELKIRK, C. G.; KILEN, S. M.; COOK, R. W.; KIPP, J. L.; SHEA, L. D.; MAYO, K. E.; WOODRUFF, T. K. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. **Dev. Biol.** v. 298, n. 1, p. 132-148, 2006

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Vasoactive intestinal peptide improves the survival and development of caprine preantral follicles after in vitro tissue culture. **Cells, Tissues, Organs**, v. 191, n. 5, p. 414-421, 2010.

BUSCHER, U, CHEN, F.C., CHEN, H. KENTENICH, H, AND SCHMIADY, H. SCHMIADY, “Cytokines in the follicular fluid of stimulated and nonstimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction?” **Human Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 162–166, 1999.

CAI-HONG, M.A.; LI-YING, Y.; JIE, Q.; WEI, S.; LI, L.; YUAN, C.; QING-YUAN S. Effects of tumor necrosis factor-alpha on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. **Fertility and Sterility** v. 93, p. 920–926, 2010.

CECCONI, S.; ROSSI, G.; BARBER, M.; SCALDAFERRI, L.; CANIPARI, R. Effect of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Mouse Preantral Follicle Development in vitro. **Endocrinology**. v.145, p. 2071-2979, 2004.

CHAKRAVARTHI, V. P.; KON, S.S.R.; SIVA KUMAR, A.V.N.; BHASKAR, M.; RAO, V.H. Quantitative expression of antiapoptotic and proapoptotic genes in sheep ovarian follicles grown in vivo or cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 590–595, 2015.

CHUN, S. Y.; EISENHAUER, K. M.; KUBO, M.; HSUEH, A. J. Interleukin-1 β Suppresses Apoptosis in Rat Ovarian Follicles by Increasing Nitric Oxide Production. **Endocrinology**, v. 136, n. 7, p. 3120–3127, 1995.

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

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

DE BEM, A. R.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Efeito do intervalo de corte do tecido ovariano no tissue chopper sobre o número de folículos pré-antrais isolados a partir de ovários de vacas nelore. **ANAIS DA XII REUNIÃO ANUAL DA SBTE**, Foz do Iguaçu-PR, v. 25, p. 178-178, 1997.

DE CLERCK, L. S.; BRIDTS, C. H.; MERTENS, A. M.; MOENS, M. M.; STEVENS, W. J. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluoro chromes on cellular function. **Journal of Immunological Methods**, v. 172, p. 115-124, 1994.

DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v. 130, p. 147-156, 2005.

DINARELLO, C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **FASEB J** v. 8, p. 1314–1325, 1994.

DONG, J., ALBERTINI, D.F., NISHIMORI, K., KUMAR, T.R., LU, N., MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531-535, 1996.

EPPIG J, O'BRIEN M, WIGGLEWORTH K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 260-273, 1996.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 10, p. 97-105, 1966b.

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

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 4, p. 233-254, 1986.

ERICKSON, G.F. & SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 1, p. 9, 2003.

FERREIRA, R., GASPERIN, B., ROVANI, M., SANTOS, J., BARRETA, M., BOHERT, R., PRICE, C., GONÇALVES, P. B. D. Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, v.152, n.12, p.4957-65. 2011.

FERREIRA, R.; OLIVEIRA, J. F.; FERNANDES, R.; MORAIS, J. F.; ALVES, P. B. G. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-719. 2007b.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F. J.; FONTES, R. S.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789–799, 1993.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J. F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment or cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 5, p. 845-858, 1995.

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

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A., SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, v.395, p. 303-327, 2008.

FISCHER, R.; MAIER, O.; SIEGEMUND, M.; WAJANT, H.; SCHEURICH, P.; PFIZENMAIER, K. A TNF receptor 2 selective agonist rescues human neurons from oxidative stress-induced cell death. **PLoS One**. v. 6, n. 11, 2011.

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

FURUYA, M., TANAKA, M., TERANISHI, T., MATSUMOTO, K., HOSOI, Y., SAEKI, K., ISHIMOTO, H., MINEGISHI, K., IRITANI, A., YOSHIMURA, Y. H1foo is indispensable for meiotic maturation of the mouse oocyte. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 4, p. 895-902, 2007

GASPERIN, B. G.; FERREIRA, R.; ROVANI, M. T.; SANTOS, J. T.; BURATINI, J.; PRICE, C. A.; GONÇALVES, P. B. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion in vivo in cattle. **Reproduction**, v. 143, v. 6, p. 815-23, 2012.

GORDON, S. E.; KRAEMER, W. J.; VOS, N. H.; LYNCH, J.M.; KNUTTGEN, H.G. Effect of acid-base balance on the growth hormone response to acute high-intensity cycle exercise. **J. Appl. Physiol.** v.76, p.821-829, 1994.

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

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and nonvitrified isolated mouse preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 6, p. 2389-97, 2008.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HIRAO, Y., NAGAI, T., KUBO, M., MIYANO, T., MIYAKE, M. & SATO, S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 333-339, 1994.

HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 593-614, 2000.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.B. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **Quarterly Journal of Veterinary Science**, v. 16, p. 78-80, 1994.

HURWITZ, A.; RICCIARELLI, E.; BOTERO, L.; ROHAN, R. M.; HERNANDEZ, E. R.; ADASHI, E. Y. Endocrine- and autocrine-mediated regulation of rat ovarian (theca-interstitial) interleukin-1 beta gene expression: gonadotropin-dependent preovulatory acquisition. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3427-9, 1991.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico do Brasil, 2015.
IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, n. 4, p. 14-26, 2014.

IRELAND J, WARD F, JIMENEZ-KRASSEL F, IRELAND JLH, SMITH GW, LONERGAN P, EVANS ACO. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v. 22, p. 1687-1695, 2007.

IWAOKI, Y., MATSUDA, H., MUTTER, G. L., WATRIN, F. AND WOLGEMUTH, D. J. Differential expression of the proto-oncogenes c-abl and c-mos in developing mouse germ cells. **Experimental Cell Research** .v. 206, p. 212-219, 1993.

JAGARLAMUDI K1, RAJKOVIC A. Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models. **Molecular Cell and Biology** .v. 356, n. 1-2, p. 31-9, 2012.

JAŁOCHA, I., GABRYŚ, M.S., BAL, J. The crucial role of the proto-oncogene c-mos in regulation of oocyte maturation. **Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej**, v. 64, p. 636-641, 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. **Biologia Celular e Molecular**, Editora: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 8ª ed., 2005.

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.

KIKUCHI K, NAITO K, NOGUCHI J, SHIMADA A, KANEKO K, YAMASHITA M, TOJO H, TOYODA Y. Maturation/M-phase promoting factor: A regulator of aging in porcine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 715-722, 2000.

KNIGHT P. G.; GLISTER C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction. Review.** Aug; v. 132, n. 2, p. 191-206, 2006.

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

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

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

KRISCHEK C, MEINECKE B. In vitro maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Sci.**, v. 73, p. 129-140, 2002.

KUBELKA M, MOTLIK J, SCHULTZ RM, 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.

KYRIAKIS JM. Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. **Gene Expr.**, v. 7, p. 217–231, 1999.

LEDAN E, POLANSKI Z, TERRET M-E, MARO B. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. **Development and Biology**, v. 232, p. 400-413, 2001.

LEE, V.H. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 401-408, 2000.

LEFEBVRE C, TERRET ME, DJIANE A, RASSINIER P, MARO B, VERLHAC M-H. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein(MISS), a new MAPK substrate. **Journal of Cell Biology**, v. 157, p. 603-613, 2002.

LEMBONG, J.M.A., YAKOBY, N., SHVARTSMAN, S.Y. Spatial Regulation of BMP Signaling by patterned receptor expression. **Tissue Eng.**, v. 1, p. 1469-1477, 2008.

LEPPÄ S., BOHMANN D. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. **Oncogene.**, v. 18, p. 6158–6162, 1999.

LIMA-VERDE ,I.B.; MATOS, M.H.; SARAIVA, M.V.; BRUNO, J.B.; TENÓRIO, S.B.; MARTINS, F.; ROSSETTO, R.; CUNHA, L.D.; NAME, K.P.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes in vitro survival and development of caprine preantral follicles. **Cells Tissues Organs**, v. 19, p.240-247, 2010.

LIU Z. K et al. Effects of pregnant mare serum gonadotropin (eCG) on follicle development and granulosa-cell apoptosis in pig. **Theriogenology**, v. 59, p. 775-785, 2003.

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÁO, S. N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J. R. Shortterm preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 201-214, 2009.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N.; RODRIGUES, A. P.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 39–49, 1999.

LUND, S.A.; MURDOCH, J.; VAN KIRK, E.A.; MURDOCH, W.J. Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. **Biol. Reprod**, v. 61, n. 2, p. 388–392, 1999.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 378-386, 2009.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D.; MORORÓ, M.; SILVA, C.; RODRIGUES, G.; BRUNO, J.; MATOS, M.; CAMPELLO, C.; FIGUEIREDO, J. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and in vitro maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 134-140, 2010.

MARCINKIEWICZ, J.; KRISHNA, A.; CHEUNG, C.; TERRANOVA, P. Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal 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, LALMANACH AC, GOUDET G, GERARD N. Expression of interleukin-1 (IL-1) system genes in equine cumulus-oocyte complexes and influence of IL-1beta during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 630–636, 2002.

MASSAGUÉ J, SEOANE J & WOTTON D. Smad transcription factors. **Genes Development.**, 19: 2783-2810, 2005.

MATOS, M.H.T., LIMA-VERDE, I.B., BRUNO, J.B., LOPES, C.A.P., MARTINS, F.S., SANTOS, K.D.B., ROCHA, R.M.P., SILVA, J.R.V., BÁO S.N. & FIGUEIREDO J.R. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. **Reproduction Fertility and Development**, v. 19, p. 677-684, 2007.

MAUD C.; GUY, D.; NADINE, G. In vivo effect of interleukin-1beta and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1-9, 2005.

MAZERBOURG, S., KLEIN, C., ROH, J., KAIVO-OJA, N., MOTTERSHEAD, D. G., KORCHYNSKYI, O., RITVOS, O., HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 (GDF-9) signalling is mediated by the type 1 receptor ALK5. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 653–655, 2004.

MCGEE, E. A.; HSUE, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Review**. v. 21, p. 200-214, 2000.

MCGRAW, S., VIGNEAULT, C., TREMBLAY, K., SIRARD, M.A. Characterization of linker histone H1FO during bovine in vitro embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 692-699, 2006.

MCLAUGHLIN M, BROMFIELD JJ, ALBERTINI DF, TELFER EE. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**. v. 16, n. 9, p. 644-53, 2010.

MECHTA-GRIGORIOU F , GERALD D , YANIV M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. **Oncogene.**, v. 20, p. 2378–2389, 2001.

MERMILLOD P, TOMANEK M, MARCHAL R, MEIJER L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development.**, v. 55, p. 89-95, 2000.

MIYAZONO, K., KAMIYA, Y., MORIKAWA, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. **The Journal of Biochemistry.**, v. 147, p. 35-51, 2010.

MONNIAUX, D.; CLÉMENT, F.; DALBIÈS-TRAN, R.; ESTIENNE, A.; FABRE, S.; MANSANET, C.; MONGET, P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? **Biol Reprod.** v. 90, n. 4, p. 85, 2014.

MORRISON, L. J.; MARCINKIEWICZ, J. L. Tumor necrosis factor alpha enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 450-457, 2002.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, p. 56-62, 1990.

MURDOCH, W. W.; SWARBRICK, S. L.; LUCK, R. F.; SANDRA WALDE, S.; YU, D. S. Refuge Dynamics and Metapopulation Dynamics: An Experimental Test. **The American Naturalist**. v. 147, n. 3, p. 424-444, 1996.

MUTTER, G. L. AND WOLGEMUTH, D. J. Distinct developmental patterns of c-mos protooncogene expression in female and male mouse germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences . USA**, v. 84, p. 5301-5305, 1987.

NAKAYAMA M , MANABE N, INOUE N , MATSUI T, MIYAMOTO H. Changes in the expression of tumor necrosis factor (TNF) α , TNF α receptor (TNFR) 2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries. **Biology of Reproduction** v. 68, p. 530 – 535, 2003.

NAZ, R. K.; ZHU, X.; MENGE, C . A.Expression of tumor necrosis factor- α and its receptors type I and type II in human oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, n. 2, p. 127–133, 1997.

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.

NYSTRÖM, M.; RUOHOMÄKI, K.; KAIPIA, L. Humic acid as a fouling agent in filtration. **Desalination**. v. 106, n. 1–3, p. 79–87, 1996.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 1682-1686, 2003.

OHTA, Y., NAKAGAWA, K., IMAI, Y., KATAGIRI, T., KOIKE, T., TAKAOKA, K. Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway. **The Journal of Bone and Mineral Metabolism** ., v. 26, p. 478-484, 2008.

OTANI, H, YAMOTO, M, FUJINAGA, H, NAKANO, R. Presence and localization of endothelin receptor in the rat ovary and its regulation by pituitary gonadotropins. **Eur Journal Endocrinology**,v. 135, p. 449–454, 1996.

PAN Z.; ZHANG J.; LI Q.; LI Y.; SHI F.; XIE Z.; LIU H. Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. **J Genet Genomics**. v. 39, n. 3, p. 111-23, 2012

PAN, H., O'BRIEN M, J., WIGGLESWORTH, K., EPPIG, J. J. AND SCHULTZ, R. M. Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. **Dev. Biology**. v. 286, p. 493-506, 2005.

PASSOS, J.R.S.; COSTA, J.J.N.; DA CUNHA, E.V.; SILVA, A.W.B.; RIBEIRO, R.P.; DE 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. Protein and messenger RNA expression of

interleukin 1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial follicle activation and survival in vitro. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 54, p. 48–59, 2016.

PENNETIER, S., UZBEKOV A, S., PERREAU, C., P APILLIER, P., MERMILLOD, P., DALBIES-TRAN, R. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15*, and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1359–1366, 2004.

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

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

RACKI, W.J., RICHTER, J.D. CPEB controls oocyte growth and follicle development in the mouse. **Development**, v. 133, p. 4527-37, 2006.

REDDY, P.; ZHENG, W.; LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. **Trends Endocrinol Metab.** v. 21, n. 2, p. 96-103, 2010.

RICE, M. V.; WILLIAMS, V. R.; LIMBACK, S. D.; TERRANOVA, P. F. Tumour necrosis factor-alpha inhibits follicle stimulating hormone-induced granulosa cell oestradiol secretion in the human: dependence on size of follicle. **Human Reproduction**, v. 11, n. 6, p. 1256-1261, 1996.

ROBY KF, SON DS, TERRANOVA PF. Alterations of events related to ovarian function in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. **Biology of Reproduction** v. 61, p. 1616–1621, 1999.

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

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

ROSSETTO R., SARAIVA M. V., DOS SANTOS R. R., DA SILVA C. M., FAUSTINO L. R., CHAVES R. N., BRITO I. R., RODRIGUES G. Q., LIMA I. M., DONATO M. A., PEIXOTO C. A., DE FIGUEIREDO J. R. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**. v. 21, n. 2, p. 125-8, 2013.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; NAME, K. P. O.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J.R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112–123, 2009.

SADEU, J.C; CORTVRINDT, R; RON-EL, R; KASTERTEIN, E; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 1, p. 1130-1141, 2006.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 644-645, 2002.

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

SANTOS, K.R.P. et al. Analise Histologica do ovário de ratas submetidas a ausencia de luz. **Ver. Bras. Ciência e Saúde**, v.10, p. 269-276, 2006.

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

SASSON, R.; WINDER, N.; KEES, S.; AMSTERDAM, A. Induction of apoptosis in granulosa cells by TNF alpha and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 294, n. 1, p. 51-59, 2002.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil De MedecineVeterinaire**, v. 157, p. 29-38, 1981.

SCHMIDT, H. H. H. W.; WALTER, U. NO at work. **Cell**. v. 78, n. 6, p. 919–925, 1994.

SCHMIERER, B., HILL, C.S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. **Nat. Rev. Molecular and Cellular Biology**., v. 8, p. 970-82, 2007

SCHOTANUS, K.; HAGE, W.J.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 48, p. 471-483, 1997.

SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. **2nd Ed. Washington: Current ConceptionsInc.**, p. 368, 2003.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 59-72, 2000.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, n. 3, p. 203-209, 2002.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK R.; FIGUEIREDO J.R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 55, p. 23-135. 2016.

SIMS, J. E.; DOWER, S. K. Interleukin-1 receptors. **Eur Cytokine Network**, v. 5, p. 539–546, 1994.

SMITZ, J.E.J. & CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v. 123, p. 185-202, 2002.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Anim Reprod**. v. 2, n. 3, p. 147-160, 2005.

SPICER, L. J. Receptors for insulin growth factor-1 and tumor necrosis factor- α are hormonally regulated in bovine granulosa and thecal cells. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 45-58, 2001.

SPICER, L. J., AAD, P. Y., ALLEN, D. T., MAZERBOURG, S., PAYNE, A. H., HSUEH, A. J. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: Influence of follicle size on responses to GDF9. **Biol. Reproduction**, v. 78, p. 243– 253, 2008.

SPICER, L. J., AAD, P. Y., ALLEN, D., MAZERBOURG, S., HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **The Journal of Endocrinology**, v.189, p. 329-339, 2006.

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. 109–15, 1998.

STEFANSDOTTIR, A.; FOWLER, P. A. ; POWLES-GLOVER, N.; ANDERSON, R. A.; SPEARS, N. Use of ovary culture techniques in reproductive toxicology. **Reproductive Toxicology**. v. 49, p. 117–135, 2014.

SUH, C.S.; SONNTAG, B; ERICKSON, G.F. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**. v. 3, n. 1, p. 5-12, 2002.

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

TANAKA, M., KIHARA, M., HENNEBOLD, J.D., EPPIG, J.J., VIVEIROS, M.M., EMERY, B.R., CARRELL, D.T., KIRKMAN, N.J., MECZEKALSKI, B., ZHOU, J., BONDY, C.A., BECKER, M., SCHULTZ, R.M., MISTELI, T., DE LA FUENTE, R., KING, G.J., ADASHI, E.Y. H1FOO is coupled to the initiation of oocytic growth. **Biology of Reproduction**, v.72, p.135-142, 2005.

TANG, K.; YANG, W.C.; LI, X.; WU, C.J.; SANG, L.; YANG, L.G. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. **Anim Reprod Sci**. v. 131, n. 3–4, p. 129–134, 2012.

TANWAR, P.S., MCFARLANE, J.R. Dynamic expression of bone morphogenetic protein 4 in reproductive organs of female mice. **Reproduction**, v. 142, p. 573-579, 2011.

TELFER, E.E. In vitro Models for Oocyte Development. **Theriogenology**, v. 49, p. 451-460, 1998.

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

VAN DEN HURK, R., BEVERS, M. M., BECKERS, J. F.; In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73–82, 1997.

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

VAN DEN HURK, R; SPEK, E.R; HAGE, W.J; FAIR, T; RALPH, J.H; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 6, p. 833-841, 1998.

VASCONCELOS, G. L., SARAIVA, M.V.A., COSTA, J.J.N., PASSOS, M. J., SILVA, A.W.B., ROSSI, R.O.D.S., PORTELA, A. M. L. R., DUARTE, A.B.G., MAGALHÃES-PADILHA, D.M., CAMPELLO, C.C., FIGUEIREDO, J, VAN DEN HURK, R., SILVA, J.R.V. Effects of growth differentiation factor-9 and FSH on in vitro development, viability and mRNA expression in bovine preantral follicles. **Reproduction of Fertility Dev.**, v.25, p.1194 - 1203, 2012.

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

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.

VITT, U. A., MAZERBOURG, S., KLEIN, C., HSUEH, A. J. W. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 473-480, 2002.

WU, B., IGNOTZ, G., CURRIE W. B., YANG, X. Expression of Mos proto-oncoprotein in bovine oocytes during maturation in vitro. **Biol. Reproduction**, v. 56, n. 1, p. 260-265, 1997.

YAN, Y.; AN, P.; NING, J.; ZHAO, G; YANG, W.; LEI, A. H1foo is essential for in vitro meiotic maturation of bovine oocytes. **Zygote**. v. 23, n. 3, p. 416–425, 2014.

ZAMORANO, P. L.; MAHESH, V. B.; DE SEVILLA, L. M.; CHORICH, L. P.; BHAT, G. K.; BRANN, D.W. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. **Neuroendocrinology**, v.65, p. 223-228, 1997.

ZHANG M , TRACEY K. J. Tumor necrosis factor. In: Thomson A , ed. The cytokine handbook. San Diego: **Academic Press**; p. 517–548, 1998.

ZHAO, X.; SINGH, B.; ARLINGHAUS, R. B. Inhibition of c-mos protein kinase blocks mouse zygotes at the pronuclei stage. **Oncogene**, v. 5, p. 1423-1426, 1991a.

ZHAO, X.; SINGH, B.; BATTEN, B. E. The role of c-mos proto-oncoprotein in mammalian meiotic maturation. **Oncogene**, v.6, p.43-9, 1991b.

ZOLTI, M.; BIDER, D.; SEIDMAN, D. S. Cytokine levels in follicular fluid of polycystic ovaries in patients treated with dexamethasone. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 501-504, 1992.