

LOCALIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO SISTEMA INTERLEUCINA 1 EM FOLÍCULOS OVARIANOS NA ESPÉCIE BOVINA.

José Renato de Sousa Passos¹, Katianne Freitas dos Santos², Glaucinete Borges de Souza³,
Tânia de Azevedo Lopes¹, Ellen de Vasconcelos da Cunha⁴, José Roberto Viana Silva⁵

Resumo

As citocinas exercem várias funções no ovário, estando envolvida nos processos de crescimento folicular, esteroidogênese, recrutamento e ativação de leucócitos necessários para a ovulação e remodelação tecidual durante a luteinização, ovulação, e luteólise. Apesar de o sistema interleucina 1 exercer um importante papel na função ovariana, ainda não há dados que informem a sua marcação em folículos ovarianos da espécie bovina. O objetivo do trabalho foi demonstrar através da técnica de imunohistoquímica a localização das proteínas dos componentes do sistema interleucina 1, durante o crescimento folicular de folículos ovulatórios bovinos. Para a localização dessas proteínas foi realizado um estudo imunohistoquímico. Em conclusão, observou-se marcação positiva para a grande maioria do sistema interleucina 1, das quais podemos destaca: interleucina 1 beta (IL-1 β), os dois receptores de interleucina 1 (IL-RI e IL-RII), e no antagonista natural de receptor (IL-1RA), com exceção da interleucina 1 alfa (IL-1 α).

Palavras-chave: bovinos; interleucina; imunohistoquímica

Introdução

Foi observado nos últimos anos que, a pecuária brasileira sofreu um ganho enorme de volume e na produtividade, chegando a 212,8 milhões de cabeças. De acordo com Serapião (2008), a utilização de novas técnicas de produção, incluindo assim diversas biotecnologias que estão ligadas à reprodução animal, pode contribuir para que nosso país esteja classificado como sendo o maior possuidor do maior rebanho bovino comercial do mundo, e o maior exportador mundial de carne bovina. Segundo Pavão (2009), o Brasil tornou-se o primeiro país do mundo em número de produção embriões *in vitro*.

O desafio dos pesquisadores da área de reprodução animal é aumentar, de forma progressiva, a eficiência da produção de embriões a partir de fêmeas de alta produtividade. Quando se considera que ovário bovino contém milhares de folículos pré-antrais (~300.000) e que é possível isolar cerca de 70.000 de oócitos inclusos em folículos pré-antrais de um ovário bovino (BEM *et al.*, 1997), pode-se vislumbrar a produção de milhares de embriões a partir de um ovário. Para isto, torna-se necessário compreender a fisiologia ovariana em bovinos e desenvolver sistemas de cultivo *in vitro*

que possibilitem o crescimento de milhares de folículos pré-antrais até estarem aptos à maturação *in vitro*. Apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante as duas últimas décadas, o entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular e maturação oocitária ainda não foram alcançados.

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

A ovulação em mamíferos pode ser considerada uma reação inflamatória e os folículos ovarianos representam um local de síntese, recepção e ação da interleucina-1 β (IL-1 β) (BRANNSTRÖM *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).

Apesar de o sistema interleucina 1 exercer um importante papel na função ovariana, ainda não há dados que informem a sua marcação em folículos ovarianos da espécie bovina.

As citocinas são sintetizadas por uma ampla gama de tipos de células, incluindo as células de ovário e são capazes de estimular ou inibir o crescimento de células, regular a diferenciação celular, induzir quimiotaxia de células e modular a expressão de outras citocinas. Ainda, as citocinas exercem várias funções no ovário, estando envolvida nos processos de crescimento folicular, esteroidogênese, recrutamento e ativação de leucócitos necessários para a ovulação e remodelação tecidual durante a luteinização, ovulação, e luteólise (BÜSCHER *et al.*, 1999).

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), 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).

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 (BRANNSTRÖM *et al.*, 1993b) e coelhas (TAKEHARA, *et al.*, 1994). Além disso, a IL-1 β induz o rompimento da vesícula germinativa de oócitos em coelhas (TAKEHARA, *et al.*, 1994) e induz a retomada da meiose em oócitos equinos (MARTORIATI *et al.*, 2002), sugerindo um papel potencial de IL-1 β na maturação nuclear do oócito (CAILLAUD *et al.*, 2005). Desta forma, sabe-se que o IL-1 β é um fator

parácrino que está envolvido na cascata de eventos que levam à ovulação (BEN-SHLOMO *et al.*, 1994) e a maturação oocitária.

O objetivo do trabalho foi demonstrar através da técnica de imunohistoquímica a localização das proteínas dos componentes do sistema interleucina 1, durante o crescimento folicular de folículos ovulatórios bovinos.

Metodologia (Materiais e Métodos)

Ovários bovinos (n=20) de vacas cíclicas foram coletados em abatedouro local, e transportados até o laboratório em um período máximo de 1 hora. Os vinte pares destes ovários foram fixados em paraformaldeído 4% (em tampão fosfato salino – PBS, pH 7,2–7,4) e subsequentemente desidratados e embebidos em parafina para estudo imunohistoquímico.

O estudo imunohistoquímico para localização do Sistema Interleucina 1 foi realizado em secções seriadas de 5µm. Estas secções foram montadas em lâminas revestidas com uma camada de poli-L-lisina, desparafinizadas em xilol e reidratadas em concentrações seriadas de etanol. A atividade da enzima peroxidase endógena foi bloqueada por meio da incubação das secções desparafinizadas em uma solução contendo 10% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Em seguida, as secções serão lavadas em PBS (pH 7,4) e colocadas em tampão citrato 0,01M (pH 6,0) onde os epítomos serão ativados por meio da ebulição do tampão por dez minutos em panela à vapor. Após este tratamento, as secções foram lavadas em PBS contendo 0,05 de *Tween* 20 (PBS-T, Merck, Darmstadt, Germany) antes de serem incubadas por 30 minutos em 5% de soro normal caprino em PBS para minimizar as ligações inespecíficas. As secções foram incubadas a 4°C por 2 (duas) horas nas diluições apropriadas para cada anticorpo primário [anti – IL-1α (1:25), IL-1β (1:25), IL-1RI (1:300), IL-1 RII (1:300) e IL-1RA (1:300)]. Em seguida, todas as demais incubações e lavagens foram realizadas em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas três vezes em PBS e incubadas por 45 minutos no anticorpo secundário apropriado (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA), diluído 1:200 em PBS contendo 5% de soro normal caprino. Em seguida, as secções foram lavadas em PBS-T antes de serem incubadas por 45 minutos com o complexo avidina-biotina (1:600, Vectastain Elite ABC kits; Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). As secções foram, em seguida, lavadas e coradas com diaminobenzidina (DAB; 0.05% DAB em Tris/HCl, pH 7.6, 0.03% H₂O₂ - Sigma tablets, St. Louis, MO, USA) por 10 minutos. As secções foram lavadas em PBS e contracoradas com hematoxilina por 10 segundos. Finalmente, as secções foram lavadas por 10 minutos em água corrente, desidratadas em etanol e xilol, e montadas em bálsamo do Canadá. A intensidade da reação para cada anticorpo nas diferentes categorias foliculares foi classificada como ausente (-), positiva (+), moderada (+ +), ou intensa (+ + +), de acordo com SIMÓN *et al.* (1994).

Os controles para reações inespecíficas foram realizados da seguinte forma: (1) substituição do anticorpo primário com IgG da mesma espécie em que o anticorpo específico foi produzido e na mesma concentração por soro normal caprino em PBS; (2) pré-absorção do anticorpo secundário com o peptídeo utilizado para sua síntese em uma concentração cinco vezes maior do que a do anticorpo primário, a temperatura ambiente por 45 minutos; (3) incubação somente com diaminobenzidina para excluir a possibilidade de atividade da peroxidase endógena não suprimida e Os folículos ovarianos foram classificados como pré-antrais (primordiais, primários e secundários) de acordo com o número de camada de células da granulosa, bem como em folículos antrais pequenos (0,5 - 1 mm em diâmetro), médios (1 - 3 mm) ou grandes (>3 mm). Os folículos também serão classificados como normais ou degenerados de acordo com a morfologia do oócito e das células da granulosa.

Resultados e Discussões

A localização do Sistema Interleucina 1 foi realizada por imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que não houve marcação para IL-1 α no ovário bovino durante o crescimento folicular de folículos pré-antrais e antrais, mostrando assim as seguintes marcações nos compartimentos foliculares: oócito (marcação negativa -), células da granulosa (CG) (marcação negativa -), células da teca (marcação negativa -) e estroma (marcação negativa -), de acordo com a classificação de SIMÓN, *et al.* (1994), como mostrado na **tabela 1 e 2**. Durante o desenvolvimento folicular, a presença de IL-1 α em folículos pré-antrais não foi evidenciada em nenhum dos compartimentos foliculares (**figura 1 A-D**). Para IL-1 β durante o crescimento folicular, foi observado as seguintes marcações: oócito (marcação moderada ++), células da granulosa (CG) (marcação intensa +++), células da teca (marcação moderada ++) e estroma (marcação positiva +). Durante o desenvolvimento folicular, a presença de IL-1 β foi evidenciada em: oócito (marcação intensa +++), células da granulosa (CG) (marcação intensa +++), células da teca (marcação moderada ++), células do cumulus (marcação moderada ++) e estroma (marcação moderada ++) (**figura 2 A-D**). Em se tratando da IL-1RI durante o crescimento folicular, foi observado as seguintes marcações: oócito (marcação positiva +), células da granulosa (CG) (marcação moderada ++), células da teca (marcação positiva +) e estroma (marcação positiva +). Durante o desenvolvimento folicular, a presença de IL-1RI foi evidenciada em: oócito (marcação moderada ++), células da granulosa (CG) (marcação moderada ++), células da teca (marcação moderada ++), células do cumulus (marcação moderada ++) e estroma (marcação positiva +) (**figura 3 A-D**). No que diz respeito a IL-1RII durante o crescimento folicular, foi observado as seguintes marcações: oócito (marcação positiva +), células da granulosa (CG) (marcação moderada ++), células da teca (marcação positiva +) e estroma (marcação positiva +). Durante o desenvolvimento folicular, a

presença de IL-1RII foi evidenciada em: oócito (marcação moderada ++), células da granulosa (CG) (marcação intensa +++), células da teca (marcação moderada ++) e estroma (marcação positiva +) (**figura 4 A-D**). Com relação a IL-1RA, durante o crescimento folicular, foi observado as seguintes marcações: oócito (marcação positiva +), células da granulosa (CG) (marcação intensa +++), células da teca (marcação moderada ++) e estroma (marcação positiva +). Durante o desenvolvimento folicular, a presença de IL-1RA foi evidenciada em: oócito (marcação intensa +++), células da granulosa (CG) (marcação intensa +++), células da teca (marcação moderada ++), células do cumulus (marcação intensa +++ e estroma (marcação moderada++) (**figura 5 A-D**).

Tabela 1: Identificação das Citocinas (Sistema IL-1) através da imunohistoquímica em folículos pré-antrais em ovários bovinos.

	Oócito	Células da Granulosa	Células da Teca	Estroma
IL-1 α	-	-	-	-
IL-1 β	++	+++	++	+
IL-1RI	+	++	+	+
IL-1RII	+	++	+	+
IL-1RA	+	+++	++	+

(-) Ausente; (+) positivo; (++) moderado; (+++) intenso

Tabela 2. Identificação das Citocinas (Sistema IL-1) através da imunohistoquímica em folículos antrais em ovários bovinos.

	Oócito	Células da Granulosa	Células da Teca	Cumulus	Estroma
IL-1 α	-	-	-	-	-
IL-1 β	+++	+++	++	++	++
IL-1RI	++	++	++	++	+
IL-1RII	++	+++	++	+	+
IL-1RA	+++	+++	++	+++	++

(-) Ausente; (+) positivo; (++) moderado; (+++) intenso

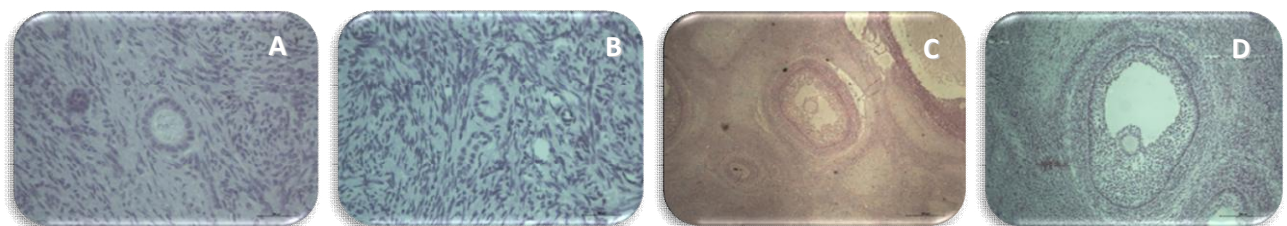


Figura 1. Marcação por imunohistoquímica da proteína IL-1 α durante o crescimento folicular. (A) folículos pré-antrais; (B) controle negativo pré-antral; (C) folículo antral; (D) controle negativo antral.

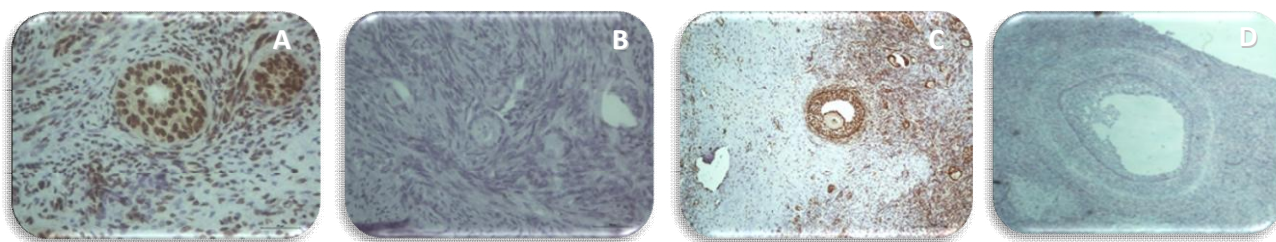


Figura 2. Marcação por imunohistoquímica da proteína IL-1 β durante o crescimento folicular. (A) folículos pré-antrais; (B) controle negativo pré-antral; (C) folículo antral; (D) controle negativo antral.

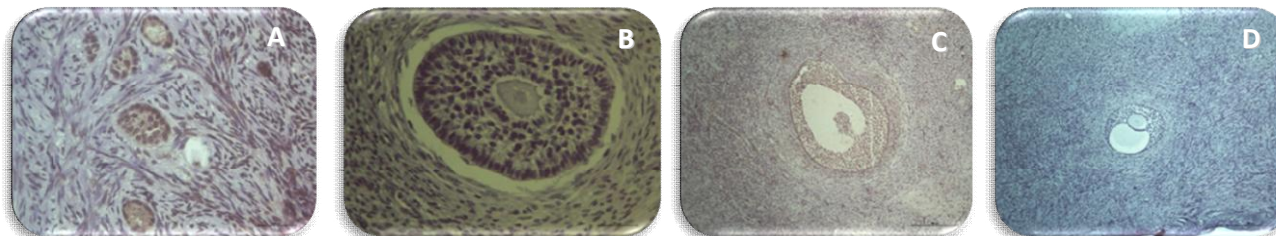


Figura 3. Marcação por imunohistoquímica da proteína IL-1RI durante o crescimento folicular. (A) folículos pré-antrais; (B) controle negativo pré-antral; (C) folículo antral; (D) controle negativo antral.

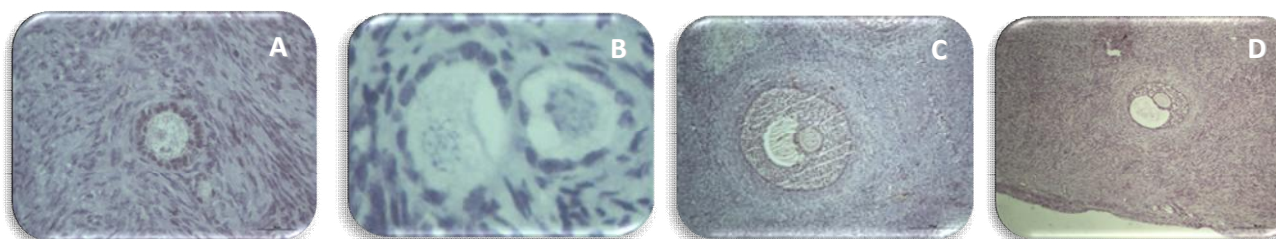


Figura 4. Marcação por imunohistoquímica da proteína IL-1RII durante o crescimento folicular. (A) folículos pré-antrais; (B) controle negativo pré-antral; (C) folículo antral; (D) controle negativo antral.

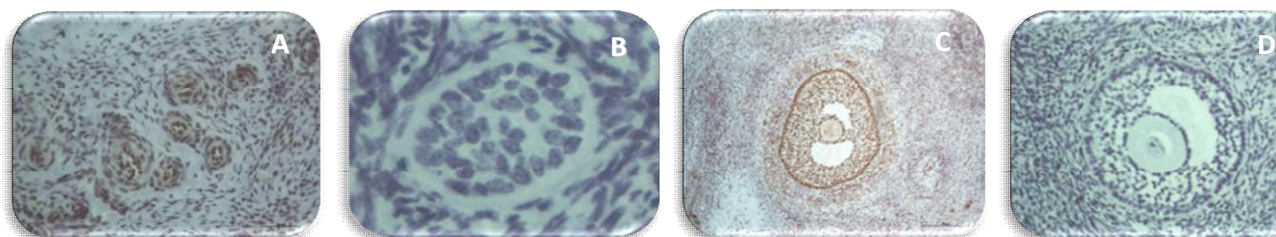


Figura 5. Marcação por imunohistoquímica da proteína IL-1RA durante o crescimento folicular. (A) folículos pré-antrais; (B) controle negativo pré-antral; (C) folículo antral; (D) controle negativo antral.

Conclusão (Considerações finais)

O presente estudo mostrou que ovário bovino é um local onde há a produção do sistema interleucina 1. Foi encontrada marcação positiva para essa citocina em diversas categorias foliculares (folículos pré-antrais e antrais), sugerindo assim uma possível participação foliculogênese. Contudo, não houve marcação positiva para a Interleucina 1 alfa (IL-1 α).

Agradecimentos



Referências

- 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.
- BEM, A. R. de.; LUCCI, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIN, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Mechanical isolation of ovarian prenatal follicles from Nelore Zebu cows. *Acta Scientiae Veterinariae*. In: Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 25, n. 1, (supl.), 1997.
- BEN-SHLOMO, I.; KOKIA, E.; JACKSON, M. J.; ADASHI, E. Y.; PAYNE, D. W. Interleukin-1 β Stimulates Nitrite Production in the Rat Ovary: Evidence for Heterologous Cell-Cell Interaction and for Insulin-Mediated Regulation of the Inducible Isoform of Nitric Oxide Synthase. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 310-318, 1994.
- BRANNSTRÖM, M.; WANG, L.; NORMAN, R. J. Ovulatory effect of interleukin 1 beta on the perfused rat ovary. *Endocrinology*, v. 132, p. 399-404, 1993b.
- BÜSCHER, U.; CHEN, F. C. K.; KENTENICH, H.; SCHMIADY. Cytokines in the follicular fluid of stimulated and nontimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Human Reproduction*, v. 14, n. 1, p. 162-166, 1999.
- CAILLAUD, M.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N. *In vivo* effect of interleukin-1beta and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. *Reproductive Biology and Endocrinology*, V. 3, p. 26, 2005.
- DINARELLO, C. A. The interleukin 1 family: 10 years of discovery. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 8, p.1314-1325, 1994.
- GOUGEON, A. The early stages follicular growth. In: TROUNSON, A. O, GSODEN, R. G. (Ed.). *Biology and pathology of the oocyte*, New York: Cambridge University Press, p. 29-43, 2003.
- KOL, S.; RUUTIAINEN-ALTMAN, K.; SCHERZER, W. J.; BEN-SHLOMO, I.; ANDO, M.; ROHAN, R. M.; ADASHI, E. Y. Ovarian interleukin 1 receptor antagonist in rats: gene expression, cellular localization, cyclic variation, and hormonal regulation of a potential determinant of interleukin 1 action. *Biology of Reproduction*, p. 1274-1282, 1999.

MARTORIATI, A.; LALMANACH, A. C.; 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.

OTANI, H.; YAMAMOTO, M.; FUJINAGA, H.; NAKANO, R. Presence and localization of endothelin receptor in the rat ovary and its regulation by pituitary gonadotropins. *European Journal of Endocrinology*, v. 132, p. 454, 1996.

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

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

SIMÓN, C.; FRANCES, A.; PIQUETTE, G.; POLAN, M. L.. Immunohistochemical Localization of the Interleukin-1 System in the Mouse Ovary during Follicular Growth, Ovulation, and Luteinization. *Biology of Reproduction*, v. 50, p. 449-457, 1994.

SIMS, J. E.; GIRI, J. G.; DOWER, S. K. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 72, p. 9-14, 1994.

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

¹ Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Bolsista da CAPES. Universidade Federal do Ceará - UFC *Campus* de Sobral. E-mail: jrenatopassos@hotmail.com;

² Graduada em Zootecnia. Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA. E-mail: katiannefreitas-@hotmail.com;

³ Discente do Curso de Graduação em Biologia/Licenciatura. Bolsista do PBU. Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA. E-mail: glaucinhaborges@hotmail.com;

⁴ Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia. Bolsista da CAPES. Universidade Federal do Ceará - UFC *Campus* de Sobral. E-mail: taniazevedosol@hotmail.com

⁵ Discente do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. E-mail: ellenvasc@hotmail.com

⁶ Orientador. Prof. Dr. Curso de Odontologia. Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. E-mail: roberto_viana@yahoo.com