

CARACTERIZAÇÃO, MECANISMO DE AÇÃO E PAPEL DO FATOR INIBIDOR DE LEUCEMIA NA FISIOLÓGIA OVARIANA E IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

[Characterization, mechanisms of action and role of leukemia inhibitory factor in ovarian physiology and embryonic implantation]

Valesca Barreto Luz, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves, Ana Kelen Felipe Lima, Ticiano Franco Pereira da Silva, Valdevane Rocha Araújo, José Ricardo de Figueiredo

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais - LAMOFOPA, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE

RESUMO - O fator inibidor de leucemia (LIF) é uma glicoproteína pertencente à família das interleucinas-6 que ligados aos seus receptores intermembranários atua em diferentes processos biológicos. Estudos têm relatado a participação deste fator durante o desenvolvimento folicular ovariano e implantação em mamíferos. Esta revisão resume os principais aspectos da estrutura molecular do LIF, seus receptores, mecanismos de ação, expressão e funções focando na fisiologia ovariana e implantação embrionária.

Palavras-Chave: LIF, ovário, folículo, endométrio, mamífero.

ABSTRACT - The leukemia inhibitory factor (LIF) is a glycoprotein from the interleukin-6 family, which acts with its membrane receptors in different biological processes. Studies have reported the involvement of this factor during ovarian follicular development and embryo implantation in mammals. This review summarizes the main aspects of the molecular structure of LIF, its receptors, mechanisms of action, expression and functions focusing on ovarian physiology and embryo implantation.

Keywords: LIF, ovarian, follicle, endometrium, mammalian.

INTRODUÇÃO

O fator inibidor de leucemia (LIF) é uma glicoproteína pertencente à família das interleucinas-6 (IL-6). É conhecido por atuar em diferentes células e tecidos através da ligação ao seu receptor de membrana (LIF-R), e a uma segunda molécula transmembranária, a gp130. Isto leva à formação de um complexo formado por LIF-LIF-R gp130 (Gearing et al., 1991; Kristensen et al., 2005), iniciando sua sinalização, que é mediada principalmente pela via JAK/STAT (Janus quinase/sinal transdutor e ativador da transcrição protéica) (Auernhammer & Melmed, 2000). Os efeitos pleiotrópicos, ou seja, altamente polifuncionais, do LIF em muitos sistemas fisiológicos incluem proliferação celular, crescimento e sobrevivência (Kamohara et al., 1997; Lass et al., 2001; Mikhaylova et al., 2008).

A atuação do LIF tem sido relatada em vários estádios da foliculogênese ovariana, a qual consiste

no processo de formação, crescimento e maturação folicular, dando origem a oócitos maduros aptos a serem fertilizados (Abir et al., 2002; 2004; Haidari et al., 2006; 2008). No ovário dos mamíferos, a expressão do LIF foi identificada em oócitos, células da granulosa e células da teca de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento (Arici et al., 1997; Nilsson *et al.*, 2002; Abir et al., 2004). Além disso, estudos indicam a atuação deste fator no mecanismo de implantação embrionária. Tais trabalhos relataram que tanto o LIF quanto o seu receptor são produzidos pelo epitélio endometrial no mesmo momento da adesão do blastocisto ao endométrio (Stewart et al., 1992; Kimber, 2005).

Com o propósito de facilitar a compreensão da importância do complexo LIF-LIF-Rgp130 (complexo ligante-receptor) na foliculogênese ovariana e no mecanismo de implantação embrionária, esta revisão fará uma abordagem sobre as características biológicas e estruturais do LIF, seus receptores e principais vias de sinalização, enfatizando suas funções e locais de expressão.

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO LIF

O LIF foi primeiramente isolado de fibroblastos de camundongos e identificado por sua habilidade de induzir a diferenciação das células leucêmicas da linhagem celular M1 em macrófagos murinos (Tomida et al., 1984). Este fator é produzido principalmente por linfócitos T ativados em resposta a diferentes estímulos (Gearing, 1993; Auernhammer & Melmed, 2000). Além disso, outros tipos celulares, incluindo fibroblastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos, mastócitos, astrócitos, sinoviócitos, condrócitos e osteoblastos também podem produzi-lo (Gearing, 1993).

O nome fator de inibidor de leucemia foi atribuído a atuação do LIF na supressão da população de células leucêmicas (Metcalf, 1992). Entretanto, esta denominação provou-se ser completamente inadequada, uma vez que esta molécula é considerada pleiotrópica, sendo bastante conhecido por possuir notáveis funções em diferentes células e tecidos (Arici et al., 1997). As atividades biológicas nas quais o LIF está envolvido incluem metabolismo ósseo, processos inflamatórios, embriogênese, crescimento, proliferação e diferenciação celular, e metabolismo lipídico (Chodorowska et al., 2004).

A família das interleucinas-6 (IL-6) da qual o LIF pertence também incluem a interleucina-11 (IL-11), o oncostatin M (OSM), o fator neurotrófico ciliar (CNTF), o cardiotropin-1 (CT-1) e cardiotropin semelhante à citocina (CLC) (Heinrich et al., 2003). O LIF é uma glicoproteína, cuja liberação ocorre através de suas células produtoras, com estrutura terciária de 4 α -hélices que contém seis resíduos de cisteína e peso molecular de 38-67 kDa. Sua estrutura terciária, da extensão N para a C terminal, consiste das hélices A, B, C e D, ligadas por 2 grandes loop AB e CD, bem como por um curto loop BC (Figura 1) (Taupin et al., 1998). Essa glicoproteína pode ser deglicolisada a uma proteína de aproximadamente 20 kDa, constituída de 180 aminoácidos, sem perder sua atividade biológica (Taupin et al., 1998; Gouch et al., 1992). A sequência gênica do LIF difere entre as espécies, tendo sido determinada em camundongos, humanos, ovelhas, porcas e ratas (Willson et al., 1992).

RECEPTORES DO LIF E VIA DE SINALIZAÇÃO

Os receptores do LIF consistem de 2 unidades glicoprotéicas (gp) ambas pertencentes a superfamília de receptores de citocina classe I. A primeira unidade possui baixa afinidade constituindo o receptor de membrana do LIF (LIF-R), também

conhecido pelos nomes LIF- α , LIF- β , gp190 ou CD118 (grupo de diferenciação 118). A outra unidade é conhecida como sinalizadora-transdutora (gp130) a qual é compartilhada por todos os membros da superfamília IL-6 (Auernhammer & Melmed, 2000; Vernallis et al., 1997; Abir et al., 2004). Quando essas duas unidades de receptores se unem, um receptor de alta afinidade é formado (Abir et al., 2004), ocorrendo uma heterodimerização, levando a formação de um complexo formado por LIF-LIF-R gp130 (Gearing et al., 1991; Kristesen et al., 2005). O LIFR é ativado não somente pelo LIF, mas também pelo CT-1, CNTF com seu receptor, e o OSM. Cada uma dessas citocinas também induz a heterodimerização do LIF-R com a gp130 (Vernallis et al., 1997).

O LIF bem como o CNTF e as IL-6 e IL-11 possuem três regiões de ligação. A análise da expressão mutagênica revelou que o sítio 1 de ligação dessas moléculas se liga com o receptor específico de citocina, enquanto o sítio 2 se liga com a gp130 (Barton et al., 1999). O sítio de ligação 3, por sua vez, tem afinidade por várias moléculas podendo se ligar com o LIF-R, no caso do LIF, mas permite o contato com a segunda molécula gp130, no caso das interleucina-6 e interleucina-11 (Hudson et al., 1996; Smith & Treutlein, 1998; Barton et al., 1999).

Após a ativação do receptor por uma das moléculas supracitadas, é desencadeada uma cascata sinalizadora Jak/STAT (Janus Quinase/Sinal Transdutor e Ativador da Transcrição), a via de sinalização compartilhada por muitos receptores de citocinas do tipo I e II. É importante destacar que todos os receptores da família de citocinas IL-6 necessitam intrinsecamente da atividade de proteínas quinases (como as Jaks, por exemplo, para sua sinalização (Hirano, 1998).

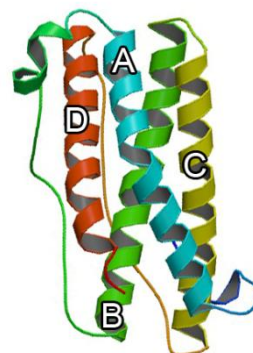


Figura 1. Estrutura terciária do LIF, contendo as hélices A, B, C e D, ligadas por 2 grandes loop AB e CD, bem como por um curto loop BC. Fonte: <http://pd-beta.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1LKI>

Uma característica central da cascata Jak/STAT é sua ativação rápida. Ambos, Jaks e STATs, são fosforilados em resíduos de tirosina em 1-15 minutos após estimulação dos receptores (Shuai et al., 1993). Esta estimulação ocorre da seguinte forma: a ligação do receptor com o ligante causa uma mudança conformacional e uma heterodimerização ou homodimerização de suas respectivas subunidades receptoras, seguida pela ativação das Jaks (Stahl e Yancopoulos, 1994; Mykhaylova et al., 2008). As Jak 1 e 2 estão associadas a subunidades citoplasmáticas dos receptores gp130 e LIF-R e são autofosforiladas, sendo ativadas somente após a ligação com o ligante e heterodimerização do complexo LIFLIF-Rgp130. Este complexo ativa as quinases Jak1, 2 e tirosina quinase 2 (tyk2), seguida pela fosforilação da gp130 e LIF-R, e pela fosforilação da tirosina do receptor e das STATs. Em seguida as STATs entram no núcleo, sendo o padrão da ativação proteica Jak/STAT pelo LIF, específico para cada tipo celular (Liu et al., 1998). A fosforilação dos resíduos de tirosina no LIF-R e gp130 também formam sítios específicos no domínio SH2 (fosfotirosina 2) das proteínas STATs, causando associação dos receptores a estes e subsequentemente fosforilação das STAT1, 3 e 5a (Shuai et al., 1993). O sítio de fosforilação da tirosina, é um fator crítico para a função e dimerização das STATs, e a sua função consiste na

regulação negativa do domínio SH2 do fator STAT (Johnson et al., 1996).

A ligação das STATs à subunidade citoplasmática do receptor causa uma abertura na associação estérica associada com Jaks, na qual pode resultar em fosforilação da tirosina da STAT. A fosforilação do sítio tirosina C-terminal das STAT3 e na STAT1 induz o domínio SH2 a autorizar a homodimerização das STAT-3- STAT-3, STAT-1- STAT-3, STAT-1- STAT-1, respectivamente (Darnell, 1997; Horvath & Darnell, 1997)

Os complexos STATs dimerizados são translocados para o núcleo, e os seus domínios DNA ligantes (AA 400-500) ligam-se à regiões específicas do DNA denominadas “STAT-Binding elements”, causando ativação transcripcional (Figura 2). Além da fosforilação da tirosina quinase, os membros da família das interleucinas-6 também causam fosforilação da serina secundária das STATs 3 e 1. A fosforilação da serina secundária das STATs tem controversamente mostrado realçar a ligação do DNA ao complexo STAT3-STAT3 ou não ter nenhum efeito. Entretanto, apesar de não afetar diretamente o DNA ligado ao complexo STAT3 aparenta ser requerido para toda transcrição dos genes STATs responsivos (Horvath & Darnell, 1997).

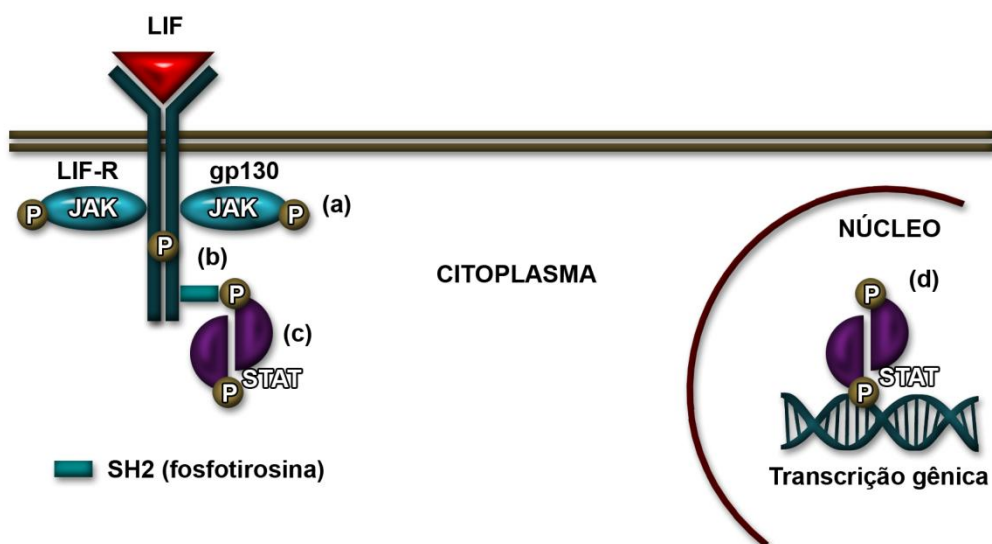


Figura 2. Após a formação do complexo e consequente heterodimerização dos receptores as proteínas Jaks associadas aos domínios citoplasmáticos desses são fosforiladas (A). Seguida pela fosforilação de tirosinas específicas nos receptores (B). Essa conformação permite sítios específicos de ligação de para os domínios SH2 das proteínas STATs. As STATs também sofrem fosforilação e consequente homodimerização (C) para daí em seguida serem translocadas para o núcleo onde vai se ligar a sequencias específicas do DNA promovendo a transcrição de genes alvos (D).

O papel da fosforilação da tirosina na ativação das Jaks é pouco claro, em parte por seu grande tamanho (peso molecular 120-140 kDa) e também devido ao grande número de tirosinas, sendo necessário uma melhor caracterização estrutural para um melhor entendimento dessas moléculas (Shuai et al., 1993; Liu et al., 1998).

Além de seu rápido início de ativação, a via Jak-STAT também está sujeita a uma regulação negativa relativamente rápida (Lee et al., 1997). Os feedbacks reguladores negativos da ativação mediada pela gp130 nas Jak/STAT incluem a fosfatase SHP-2. Recentemente uma família de citocinas específicas indutoras da sinalização de inibidores foi identificada. Essas proteínas contendo SH2 foram nomeadas de SOCS (supressor da sinalização de citocinas), JAB (Jak-associada ao fator celular B) ou SSI (inibidor de STAT) (Yoshimura et al., 1995). O mecanismo preciso pelo qual SOCS, SSI e proteínas JAB exercem seus efeitos supressivos sobre a cascata não é claro, mas parecem inibir as Jak/STAT sinalizando positivamente a fosforilação da tirosina de ambos STATs e o seu próprio receptor.

Outra família inibidora de STAT denominada PIAS (proteínas inibidoras de STAT ativadas) foi recentemente identificada. PIAS3 associada especificamente com a IL-6-ativada por Stat-3, bloqueia a sua ligação ao DNA e sua habilidade de controlar a transcrição (Chung et al., 1997). Portanto a sinalização do LIF é mediada principalmente pela via Jak/STAT e é inibido, pelas SOCS e proteínas PIAS (Auernhammer e Melmed, 2000). Estes feedbacks interferem negativamente na cascata de sinalização das Jak/STAT induzida pelo LIF em diferentes níveis. As Jaks normalmente perdem a fosforilação da tirosina dentro de 2 horas e a fosforilação da STAT e sua consequente ligação ao DNA parece diminuir entre 0,5 - 4 horas após sua estimulação (Silvennoine et al., 1993). Estudos têm demonstrado que as fosfatases podem ter um papel na desfosforilação de Jaks. Um exemplo é que estudos de Jak2 tem demonstrado que as fosfatases SHP-1 e SHP-2 podem se associar com Jak2 (Jiã et al., 1996; Yin et al., 1997). No entanto, a forma como esses mecanismos inibidores contribuem para a regulação biológica ainda precisam ser elucidados (Liu et al., 1998).

EXPRESSÃO DO LIF NO OVÁRIO

A localização do LIF no tecido ovariano já foi demonstrada em ovários de ratas. Nilsson *et al.* (2002) verificaram altos níveis da proteína do LIF nas células somáticas de folículos primordiais e primários quando comparado aos seus níveis nos

oócitos dessas categorias foliculares. Ao contrário, folículos pré-antrais em estádios mais avançados ou folículos antrais expressaram o LIF principalmente no oócito.

Em humanos, Arici *et al.* (1997) identificaram a presença de RNAm para o LIF, bem como a produção da sua proteína em células luteínicas e do estroma. A presença de LIF nas células do estroma enfatizam as células da teca como outra fonte potencial de LIF. Abir *et al.* (2004) detectaram a proteína de LIF, e seus receptores protéicos (LIF-R e gp130) em oócitos de folículos primordiais, primários e secundários oriundos de ovários fetais e adultos humanos. Entretanto, nas células do estroma verificou-se apenas a expressão do receptor LIF-R. Nesse estudo verificou-se ainda que nas células da granulosa de folículos primários e secundários de ovários adultos havia apenas a presença do receptor LIF-R. Outro estudo, em humanos, detectou a presença dos RNAm dos receptores LIF-R e gp130 em oócitos e embriões pré-implantados (Van Ejjik et al., 1986).

PAPEL DO LIF NA FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e a maturação folicular (van den Hurk & Zhao, 2005). No início do crescimento folicular, fase conhecida como ativação, os folículos primordiais passam do *pool* de reserva ou folículos quiescentes para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário e/ou pré-ovulatório; Russe, 1983). No entanto, os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação de folículos primordiais, bem como os mecanismos envolvidos no início do crescimento folicular são ainda enigmáticos e representa uma das maiores questões relacionadas com a biologia ovariana. Nesse contexto, estudos têm mostrado que vários fatores de crescimento produzidos pelas células foliculares podem estar relacionados com a ativação e posterior desenvolvimento desses folículos (Figueiredo et al., 2008).

Assim, a importância do LIF para a foliculogênese foi atestada em animais de laboratório, nos quais foi observado que os níveis do LIF no fluido folicular aumentam conforme o folículo se desenvolve, promovendo o crescimento oocitário, a manutenção da viabilidade, bem como o desenvolvimento dos folículos pré-antrais até sua maturação (Haidari et al., 2006; 2008). Essas características foram confirmadas em mulheres, uma vez que este fator foi capaz de promover a ativação de folículos primordiais (Abir et al., 2004). Além disso, o LIF foi capaz de reduzir a taxa de apoptose, mostrando sua

atividade como fator de sobrevivência celular no cultivo de células germinativas primordiais de camundongas (Pesce et al., 1993; Morita et al., 1999) e de ovários fetais humanos (Abir et al., 2002).

O LIF pode atuar de maneira direta e indireta, nesta última ele pode agir sinergicamente com outros fatores de crescimento aumentando a expressão destas substâncias (Kezele et al., 2002). A sua associação à insulina (Kezele et al., 2002) e ao *Kit ligand* (Nilsson et al., 2002) promoveu a transição de folículos primordiais para primário em ratas. Outro estudo relatou que a associação do LIF e fator de crescimento epidermal (EGF), mostrou-se importante para melhorar a competência oocitária em camundongas (Amiri et al., 2009). Além disso, o LIF promoveu a proliferação das células da granulosa e da teca (Haidari et al., 2008) via aumento da expressão do RNAm para o *kit ligand* (KL) (Nilsson et al., 2002). Outro exemplo de ação indireta do LIF foi verificado por De Matos et al. (2008) que mostraram o envolvimento do LIF associado ao hormônio folículo estimulante (FSH) na expansão das células do *cumulus* de oócitos de camundongas e mulheres. Já o efeito direto ocorre pela presença do ligante e de seus receptores em ambos, oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais conforme demonstrado em humanos (Abir et al., 2004).

Brannstrom e Norman (1993) e Adashi (1994) verificaram que a presença de LIF no fluido folicular está relacionada aos eventos de desenvolvimento oocitário, durante a foliculogênese e ovulação propriamente dita. Outro aspecto positivo da presença do LIF no fluido folicular está na correlação entre os níveis deste fator e as concentrações de estradiol, uma vez que à medida que o folículo se desenvolve aumentam as concentrações de ambos (Arici et al., 1997; Coskun et al., 1998). Estes autores sugerem que a atuação do LIF na fisiologia da ovulação e produção de estrógeno ocorre por intermédio da enzima aromatase, uma vez, que em um estudo foi observado aumento na expressão da aromatase pela adição de LIF ao cultivo de tecido adiposo humano (Zhao et al., 1995).

IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E LIF

A implantação é o termo aplicado para o processo pelo qual o blastocisto se adere à parede do útero. Para a implantação do blastocisto e estabelecimento da gestação é exigida uma delicada interação entre o embrião e o ambiente materno. Um processo altamente coordenado é realizado pelas células do

trofotoderma e do trofoblasto embrionárias para estabelecer contato com o endométrio uterino. Esse processo é mediado por fatores de crescimento, citocinas e moléculas da matriz extracelular. Dentre as citocinas, o LIF, ajuda na implantação do blastocisto. Esta citocina, o seu receptor (LIF-R) e o sinalizador da transdução da interleucina-6 (IL6ST), estão implicados na receptividade do útero à implantação de um grande número de espécies, incluindo humanos, primatas, roedores, suínos, bovinos e de ovinos (Auernhammer e Melmed 2000, Kimber, 2005).

O LIF foi a primeira citocina a ter sido mostrado essencial para a implantação em camundongas, uma vez que camundongas com nocauteb para o gene do LIF mostraram-se inférteis devido a uma falha de implantação (Stewart et al., 1992; Fouladi-Nashta et al., 2005). Além disso, a administração de LIF exógeno a fêmeas mutantes homozigotas, ou seja, aquelas que possuem dois alelos negativos para o LIF, restaurou a capacidade de implantação embrionária no útero destas (Stewart et al., 1992, Chen et al., 2000, Sherwin et al., 2004). No entanto, embriões nocauteados para o gene do LIF após transferidos para receptoras selvagens têm capacidade de se implantar e desenvolver normalmente (Robb et al., 1998, Chen et al., 2000).

Tanto o LIF quanto o seu receptor são produzidos pelo epitélio endometrial no mesmo momento da adesão do blastocisto ao endométrio (Stewart et al., 1992), sendo esta uma importante evidência *in vivo* de que o LIF é fundamental para o estabelecimento da gestação em camundongas. Outro trabalho também identificou a expressão de LIF-R em células do estroma decidualizado adjacente à implantação do blastocisto, sugerindo um papel potencial para o LIF na decidualização em camundongas (Ni et al., 2002).

Em mulheres, mutações no receptor do LIF promoveram início de pré-eclampsia combinada com retardo de crescimento intra-uterino (Reister et al., 2006). Além disso, a presença desta citocina pode ser detectada em lavados uterinos, apresentando níveis inferiores em mulheres com infertilidade e seus níveis mais elevados são indicativos de inflamação (Laird et al., 1997; Ledee-Bataille et al., 2002). Portanto, uma quantidade adequada de LIF se faz necessária para que a implantação ocorra a contento.

Em ruminantes, como a implantação não é invasiva, o LIF pode não ser obrigatório para este processo, mas parece ter um papel durante o estabelecimento da gestação (Vogiagis et al., 1997b). Durante a fase inicial da gestação foi observada a expressão de

RNA_m e a proteína para LIF no útero de ovelhas (Vogiagis et al., 1997 a,b). Além disso, outro estudo mostrou que o receptor para o LIF e sua proteína sinalizadora, a IL6ST, são regulados pelo interferon τ (IFNT) e pela progesterona (P₄), indicando que o LIF atua na função endometrial, e no crescimento e diferenciação do trofocotoderma em ovinos (Song et al., 2009).

Em relação ao controle da expressão gênica, a p53 desempenha um papel importante na regulação da transcrição do LIF em camundongos (Hu et al., 2007). A P₄ também regula a expressão de LIF em primatas, sob sua influência, as células epiteliais uterinas tornam-se altamente secretoras. Análises de fluido uterino e dados de imuno-histoquímica indicam que moléculas regulatórias, incluindo LIF (Hannan et al., 2004; Jones et al., 2004) são liberadas no lúmen uterino, onde pode afetar o blastocisto, mesmo antes de adesão. Estudos em mulheres com o antagonista do receptor de P₄, o mifepristone (RU486), imediatamente após a ovulação, reduziu os níveis de LIF no momento da implantação promovendo falha nesta (Danielsson et al., 1997). Esta citocina também é regulada localmente por outras substâncias como EGF ligada a heparina (HB-EGF) (Arici et al., 1995; Lessey, 2002) prokineticin 1 (PROKR1) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Licht et al., 2007; Evans et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais o LIF pode regular a adesão do trofoblasto foram revelados por estudos da expressão de RNA_m para moléculas de adesão do epitélio endometrial. O LIF aumentou a expressão de RNA_m para integrinas $\alpha 2$ e a produção desta proteína pelas células epiteliais endometriais. Por fim, o LIF também regula a adesão dessas células ao colágeno IV através da proteína integrina A2B1 (Marwood et al., 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme foi visto, o LIF vem sendo objeto de estudo em diferentes grupos ao redor do mundo. Entretanto, por sua diversificada atuação em células e tecidos tão distintos, os mecanismos que regulam suas ações nestes permanecem obscuros, especialmente no que se refere a sua participação em processos complexos como foliculogênese e implantação embrionária. Nesse sentido, pesquisadores têm voltado seus esforços para verificar o complexo sistema de sinalização envolvendo ligantes e receptores deste fator, bem como a participação de outras moléculas que podem atuar sinergicamente ou não junto ao LIF no controle e regulação desses processos. A

compreensão do papel do LIF na foliculogênese desde a fase pré-antral até antral poderá resultar na melhoria de sistemas de cultivo *in vitro* de FOPA de mamíferos resultando em uma maior percentagem de oócitos maduros e conseqüentemente embriões viáveis oriundos destes oócitos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Anderson Pinto Almeida e Giovanna Quintino Rodrigues pela adaptação e criação das ilustrações.

REFERÊNCIAS

- ABIR, R. et al. Immunocytochemical detection and RT-PCR expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in human fetal and adult ovaries. *Molecular Human Reproduction*, Oxford, Inglaterra, v.10, n.5, p. 313-319, 2004.
- ABIR, R. et al. Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. *Fertility and Sterility*, Nova York, Estados Unidos, v.78, p.259-264, 2002.
- ADASHI, E. Y. *Endocrinology of the ovary*. Human Reproduction, Oxford, Inglaterra, v. 9, n. 5, p. 815-827, 1994.
- AMIRI, I. et al. The effects of LIF and EGF on mouse oocyte maturation, fertilization and development in vitro. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, Yazd, Irã, v.7. n. 4. p. 189-194, 2009.
- ARICI, A. et al. Leukemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Human Reproduction*, Oxford, Inglaterra, v.12, p. 1233-1239, 1997.
- AUERNHAMMER, C. J.; MELMED, S. Leukemia-Inhibitory Factor—Neuroimmune Modulator of Endocrine Function. *Endocrine Reviews*, Baltimore, Estados Unidos, v.21, p. 313-345, 2000.
- BARTON, V.A. et al. Identification of three distinct receptor binding sites of murine interleukin-11. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, Estados Unidos, v.274, p. 5755-5761, 1999.
- BORNSTEIN, S.R. et al. Cytokines and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Amsterdã, Holanda, v.215, n.1-2, p.135-141, 2004.
- BRANNSTOM, M.; NORMAN, R. J. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Human Reproduction*, Oxford, Inglaterra, v.8, p. 1762-1775, 1993.
- CHEN, C.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Fibroblast growth factor-10: a stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, Nova York, Estados Unidos, v.63, p. 959-966, 2000.
- CHODOROWSKA, G.; GLOWACKA, A.; TOMCZUK, M. Leukemia inhibitory factor (LIF) and its biological activity. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Medicina*, Lublin, Polônia, v. 59, n. 2, p. 189-193, 2004.
- CHUNG, J. et al. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its

- tyrosine phosphorylation. *Journal of Molecular Cell Biology*, Cary, Estados Unidos, v. 17, p. 6508–6516, 1997.
- COSKUN, S. et al. Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin-12 in human follicular fluid during follicular growth. *American Journal of Reproductive Immunology*, Copenhagen, Dinamarca, v. 40, p. 13-18, 1998.
- DARNELL JR, J.E. STATs and gene regulation. *Science*, Washington, Estados Unidos, v. 277, p. 1630–1635, 1997.
- DANIELSSON, K.G.; SWAHN, M.L.; BYGDEMANN, M. The effect of various doses of mifepristone on endometrial leukemia inhibitory factor expression in the midluteal phase—an immunohistochemical study. *Human Reproduction*, Oxford, Inglaterra, v.12, p. 1293-1297, 1997.
- DE MATOS, D. G. et al. Leukemia inhibitory factor induces cumulus expansion in immature human and mouse oocytes and improves mouse two-cell rate and delivery rates when it is present during mouse in vitro oocyte maturation. *Fertility and Sterility*, Nova York, Estados Unidos, v. 90, p. 2367-2375, 2008.
- EVANS, J. et al. Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology*, Chevy Chase, Estados Unidos, v.149, p. 2877-2887, 2008.
- FIGUEIREDO, J. R. et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo, SP: Editora Roca, 2008, cap.16, p.303-326.
- FOULADI-NASHTA, A.A. et al. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Developments in Biologicals*, Basel, Suíça, v.281, n. 1, p.1-21, 2005.
- GEARING, D. P. et al. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp 130. *The EMBO Journal*, Londres, Inglaterra, v.6, p. 2839–2848, 1991.
- GEARING, D. The leukemia inhibitory factor and its receptor. *Advances in Immunology*, Nova York, Estados Unidos, v.53, p. 51-58, 1993.
- GOUGH, N.M. et al. Molecular biology of the leukemia inhibitory factor gene. *Ciba Foundation symposium*, Amsterdã, Holanda, v.167, p. 24–46, 1992.
- HADARI, K.; SALEHNIYA, M.; VALOUJERDI, M. R. The Effects of different concentrations of leukemia inhibitory factor on the development of isolated preantral follicles from fresh and vitrified mouse ovaries. *Iranian Biomedical Journal*, Tehran, Irã, v.10, n. 4, p.185-190, 2006.
- HADARI, K.; SALEHNIYA, M.; VALOUJERDI, M. R. 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*, Nova York, Estados Unidos, v. 90, p. 2389–2397, 2008.
- HANNAN, N.J. et al. Coexpression of fractalkine and its receptor in normal human endometrium and in endometrium from users of progestin-only contraception supports a role for fractalkine in leukocyte recruitment and endometrial remodeling. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Chevy Chase, Estados Unidos, v. 89, p. 6119-6129, 2004.
- HEINRICH, P.C. et al. Principles of IL-6-type Cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical Journal*, Londres, Inglaterra, v.374, p. 1–20, 2003.
- HILTON, D.J. et al. Resolution and purification of three distinct factors produced by Krebs ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukemic cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, Estados Unidos, v.263, p.9238–9443, 1988.
- HIRANO, T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *International Reviews of Immunology*, Londres, Inglaterra, v.16, p. 249–284, 1998.
- HORVATH, C.M.; DARNELL, J.E. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Current Opinion in Cell Biology*, Londres, Inglaterra, v.9, p. 233–239, 1997.
- HUDSON, K.R.; VERNALLIS, A.B.; HEATH, J.K. Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, Estados Unidos, v.271, p. 11971–11978, 1996.
- HU, W. et al. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*, Londres, Inglaterra, v.450, p. 721–724, 2007.
- JOHNSON, L.N.; NOBLE, M.E.; OWEN, D.J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, Cambridge, Estados Unidos, v.85, p. 149-158, 1996.
- JIAO, H. et al. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Journal of Molecular Cell Biology*, Cary, Estados Unidos, v.16, p. 6985-6992, 1996.
- JONES, R.L. et al. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Chevy Chase, Estados Unidos, v.89, p. 6155-6167, 2004.
- KAMOHARA, H. et al. Leukemia inhibitory factor induces apoptosis and proliferation of human carcinoma cells through different oncogenesis pathways. *International Journal of Cancer*, Nova York, Estados Unidos, v.72, p. 687-695, 1997.
- KIMBER, S.J. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction*, Cambridge, Inglaterra, v.130, p. 2, p. 131-45, 2005.
- KRISTENSEN, D. M.; KALISZ, M.; NIELSEN, J. H. Cytokine signalling in embryonic stem cells. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, Copenhagen, Dinamarca, v. 113, p.756–72, 2005.
- LAIRD, S.M. et al. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: Presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Human Reproduction*, Oxford, Inglaterra, v.12, p. 569-574, 1997.
- LASS, A. et al. leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertility and Sterility*, Nova York, Estados Unidos, v.76, n.6, 2001.
- LEE, C.K.; BLUYSSSEN, H.A.R.; LEVY, D.E. Regulation of interferon- τ responsiveness by the duration of Janus kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, Estados Unidos, v.272, p. 21872-21877, 1997.
- LEDEE-BATAILLE, N. et al. Concentration of leukemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Human Reproduction*, Oxford, Inglaterra, v.17, p. 213-218, 2002.

- LESSEY, B.A. Adhesion molecules and implantation. *Journal of Reproductive Immunology*, Limerick, Irlanda, v.55, p.101-112, 2002.
- LICHT, P. et al. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Molecular and Cellular Endocrinology*, Amsterdã, Holanda do Norte, v.269, p.85-92, 2007.
- LIU, K.D.; GAFFEN, S.L.; GOLDSMITH, M.A. Jak/STAT signaling by cytokine receptors. *Current Opinion in Immunology*, Londres, Inglaterra, v.10, p. 271–278, 1998.
- MARWOOD, M et al. Interleukin 11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells; implications in fertility regulation. *Endocrinology*, Chevy Chase, Estados Unidos, v.150, p. 2915- 2923, 2009.
- METCALF, D. Leukemia inhibitory factor - a puzzling polyfunctional regulator. *Growth Factors*, Londres, Inglaterra, v.7, p.169-73, 1992.
- MIKHAYLOVA, I. V. et al. Leukemia inhibitory factor as a regulator of steroidogenesis in human NCL-H295R adrenocortical cells. *The Journal of Endocrinology*, Bristol, Inglaterra, v.199, p.435-444, 2008.
- MORITA, Y. et al. Requirement for phosphatidylinositol-3 ϕ -kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology*, Chevy Chase, Estados Unidos, v.140, p. 941-949, 1999.
- NI, H. et al. Expression of leukemia inhibitory factor receptor and gp130 in mouse uterus during early pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*, Nova York, Estados Unidos, v.63, n.2, p. 143-50, 2002.
- NILSSON, E.; KEZEL, P.; SKINNER, M. K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Limerick, Irlanda, v. 188, p.65-73, 2002.
- PESCE, M. et al. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by supporting programmed cell death (apoptosis). *Development*, Cambridge, Inglaterra, v. 118, p.1089-1094, 1993.
- REISTER, F. et al. Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR. *Journal of Perinatal Medicine*, Berlim, Alemanha, v.34, p. 272-279, 2006.
- ROBB, L. et al. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nature Medicine*, Nova York, v.4, p. 303-308, 1998.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica*, Basel, Suíça, v. 24, p. 77-92, 1983.
- SHERWIN, J.R. et al. Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Molecular Endocrinology*, Baltimore, Estados Unidos, v.18, p. 9, p. 2185-2195, 2004.
- SHUAI, K. et al. Polypeptide signaling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature*, Londres, Inglaterra, v.366, p. 580-583, 1993.
- SMITH, D.K.; TREUTLEIN, H.R. LIF receptor-gp130 interaction investigated by homology modeling: implications for LIF binding. *Protein Science : a Publication of the Protein Society*, Nova York, Estados Unidos, v.7, p.886–896, 1998.
- SILVENNOINEN, O. et al. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature*, Londres, Inglaterra, v.366, p.583-585, 1993.
- SONG, G. et al. Progesterone and interferon tau regulate leukemia inhibitory factor receptor and IL6ST in the ovine uterus during early pregnancy. *Reproduction*, Cambridge, Inglaterra, v.137, n. 3, p. 553-565, 2009.
- STAHL, N.; YANCOPOULOS, G.D. The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. *Journal of Neurobiology*, Hoboken, Estados Unidos, v. 25, p. 1454–1466, 1994.
- STEWART, C.L. et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, Londres, Inglaterra, v.359, p.76-79, 1992.
- TAUPIN, J.L. et al. Leukemia inhibitory factor: part of a large ingathering family. *International Reviews of Immunology*, Londres, Inglaterra, v.16, p. 397–426, 1998.
- TOMIDA, M.; YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y.; HOZUMI, M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblasts L929 cells. *The Journal of biological chemistry*, Baltimore, Estados Unidos, v.259, p.10978-10982, 1984.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of ovarian follicles and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, Nova York, Estados Unidos, v.63, p.1717–1751, 2005.
- VAN EIJK, M.J.T. et al. Expression of leukaemia inhibitory factor receptor subunits LIFR β and gp130 in human oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Human Reproduction*, Oxford, Inglaterra, v.2, n.5, p. 355-360, 1996.
- VERNALLIS, A.B.; HUDSON, K.R.; HEATH, J.K. An antagonist for the leukemia inhibitory factor receptor inhibits leukemia inhibitory factor, cardiotrophin-1, ciliary neurotrophic factor, and oncostatin M. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, Estados Unidos, v.272, p. 26947–26952, 1997.
- VOGIAGIS, D. et al. Leukaemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, Colchester, Inglaterra, v.109, n. 2, p.279-88, 1997a.
- VOGIAGIS, D. et al. Effect of immunisation against leukaemia inhibitory factor on the establishment of pregnancy in sheep. *Reproduction, Nutrition, Development*, Paris, França, v.37, n. 4, p.459-68, 1997b.
- WILLSON, T.A.; METCALF, D.; GOUGH, N.M. Cross-species comparison of the sequence of the leukemia inhibitory factor gene and its protein. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, Oxford, Inglaterra, v.204, p. 21–30, 1992.
- YIN, T. et al. Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, Estados Unidos, v.272, p. 1032-1037, 1997.
- YOSHIMURA, A. et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 2 and erythropoietin receptors. *The EMBO Journal*, Londres, Inglaterra, v.14, p.2816-2826, 1995.
- ZHAO, Y.; NICHOLS, J. E.; BULUN, S. E. Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter. *Journal of Biology Chemistry*, Baltimore, Estados Unidos, v. 270, p.16449-16457, 1995.