

A superfamília dos fatores de crescimento transformante- β e o controle da foliculogênese em mamíferos

Transforming growth factors - β superfamily members and control of folliculogenesis in mammals

J.R.V. Silva^{1,*}, C.C.F. Leitão¹, I.R. Brito²

¹Núcleo de Biotecnologia de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

*Correspondência: roberto_viana@yahoo.com

Resumo

A foliculogênese ovariana é um processo complexo caracterizado pela formação, crescimento e maturação folicular. Esta revisão discute a localização, os sítios de ação e as funções de fatores da família TGF- β [proteínas morfogenéticas ósseas dos tipos 2 (BMP-2), 4 (BMP-4), 6 (BMP-6), 7 (BMP-7), 15 (BMP-15), fator de diferenciação do crescimento-9 (GDF-9), ativina-A, inibina, hormônio anti-Mülleriano (AMH) e fator de crescimento transformante- β (TGF- β)] na regulação da foliculogênese em mamíferos. Alguns fatores, como o AMH, atuam inibindo o crescimento dos folículos primordiais e reduzindo a sensibilidade dos folículos em crescimento ao FSH, enquanto vários outros (BMP-2, 4, 7, 15, GDF-9, ativina-A e TGF- β) estimulam o crescimento folicular. Em geral, a foliculogênese é regulada por uma complexa interação desses fatores de crescimento com as gonadotrofinas.

Palavras-chave: foliculogênese, TGF- β , mamíferos.

Abstract

Ovarian folliculogenesis is a complex process that includes follicular formation, growth and maturation. This review discuss the localization and functions of TGF- β family members [bone morphogenetic proteins 2 (BMP-2), 4 (BMP-4), 6 (BMP-6), 7 (BMP-7), 15 (BMP-15), growth and differentiation factor-9 (GDF-9), activin-A, inhibin, anti-Müllerian hormone (AMH) and transforming growth factor- β (TGF- β)] in the regulation of ovarian folliculogenesis in mammals. Some of these factors, such as AMH, inhibit growth of primordial follicles and reduce sensitivity of growing follicles to FSH, while various others (BMP-2, 4, 7, 15, GDF-9, activin-A and TGF- β) stimulate follicular growth. In general, folliculogenesis is regulated by a complex interaction of these factors with gonadotrophins.

Keywords: folliculogenesis, TGF- β , mammals.

Introdução

O ovário é um órgão complexo que garante um ambiente ideal para a produção de hormônios e liberação dos gametas femininos (Johnson, 2003). Neste órgão são encontrados vários tipos celulares que incluem as células do estroma, do epitélio superficial e milhares de folículos ovarianos, sendo estes a unidade básica estrutural e funcional do ovário, que fornece as condições adequadas para o crescimento e a maturação oocitária (Cortvrindt e Smits, 2001).

Os folículos são constituídos por um ócito circundado por células do cúmulus, da granulosa muralis e da teca. De acordo com o estágio de desenvolvimento, eles são divididos em pré-antrais, que incluem os folículos primordiais, primários e secundários, e antrais que compreendem os folículos terciários e pré-ovulatórios (Figueiredo et al., 2002). Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular presente no ovário (Saumande, 1991). Entretanto, a grande maioria (99,9%) não chega até a ovulação, sendo eliminada por meio de um processo conhecido por atresia folicular (Markström et al., 2002).

A foliculogênese é um processo que consiste no desenvolvimento de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios, durante o qual ocorre crescimento oocitário e intensa proliferação das células da granulosa. Este processo é controlado por uma interação entre fatores de crescimento locais e gonadotrofinas de origem hipofisária (Van Den Hurk e Zhao, 2005). Recentemente, tem sido demonstrado que os membros da superfamília dos fatores de crescimento transformante- β (TGF- β) exercem importantes funções na regulação local da foliculogênese. Desta forma, esta revisão tem como objetivo apresentar e discutir a localização e os principais efeitos biológicos dos fatores de crescimento desta família em ovários de mamíferos.

Fatores de crescimento pertencentes à família TGF- β

A família de fatores de crescimento TGF- β é composta por mais de 40 membros que são agrupados de acordo com sua homologia estrutural (Chang et al., 2002). Diversos estudos e revisões (Drummond et al., 2003; Knight e Glister, 2003) têm mostrado que várias proteínas pertencentes à família TGF- β são expressas em oócitos, células da granulosa e da teca e funcionam como reguladores intraovarianos dos processos de ativação de folículos primordiais, proliferação de células da granulosa e da teca, esteroidogênese e maturação oocitária, bem como no processo de atresia. Os principais fatores desta família que exercem funções no controle dos processos reprodutivos são as proteínas morfogenéticas ósseas dos tipos 2 (BMP-2), 4 (BMP-4), 6 (BMP-6), 7 (BMP-7), 15 (BMP-15), o fator de diferenciação do crescimento-9 (GDF-9), a ativina-A, a inibina, o hormônio anti-Mülleriano (AMH) e o próprio fator de crescimento transformante- β (TGF- β).

BMP-2, BMP-4 e seus receptores

Estudos recentes sobre a expressão e as atividades biológicas das BMPs, mostraram que BMP-2 e BMP-4 exercem importantes funções nos processos reprodutivos. As BMPs foram inicialmente identificados em 1965, como substâncias presentes em ossos desmineralizados e que tinham a capacidade de induzir a formação de tecido ósseo. À medida que o padrão de expressão das BMPs foi descrito em vários tecidos e as suas proteínas tornaram-se disponíveis, observou-se que as BMPs também controlam os processos de formação das células germinativas primordiais, de formação das gonadotrófinas na hipófise, bem como do crescimento e da maturação folicular em ovários de camundongos (Shimasaki et al., 2004).

A expressão dos RNAs mensageiros para BMP-2 foi demonstrada em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais presentes em ovários de ratas (Erickson e Shimasaki, 2003). Em bovinos, a proteína BMP-2 também foi demonstrada em células da teca e em oócitos de folículos antrais (Fatehi et al., 2005). No tocante ao BMP-4, os RNA mensageiros e as proteínas são expressos em células da teca de ratas (Erickson e Shimasaki, 2003). Já em bovinos, a expressão de BMP-4 foi demonstrada em células da granulosa e da teca (Glister et al., 2004), bem como em oócitos de folículos antrais (Fatehi et al., 2005).

Para exercer suas funções biológicas, as BMP-2 e -4 interagem com dois tipos (I e II) de receptores presentes na superfície celular (Massagué e Chen, 2000). Inicialmente, as BMPs ligam-se com receptores de BMP dos tipos II induzindo a sua ativação. Em seguida o BMPR-II ativado promove o recrutamento e a transfosforilação do receptor de BMP do tipo IA (BMPR-IA ou ALK3) ou IB (BMPR-IB ou ALK6). A interação entre os receptores induz a fosforilação de mensageiros intracelulares (*SMADs*) que são dimerizadas com a Smad-4 (co-Smad) e deslocados para o núcleo, onde regulam a expressão de genes específicos (Massagué e Wotton, 2000). Em ovários de ratas, a expressão dos RNAs mensageiros para BMPR-II, BMPR-IA e BMPR-IB foi demonstrada em oócitos e células da granulosa de folículos primordiais, primários, secundários e antrais. No entanto, as células da teca de folículos de ratas expressam somente os RNAs mensageiros para BMPR-IA e BMPR-IB (Erickson e Shimasaki, 2003). Em caprinos, já foi demonstrada a expressão de BMP-RII, BMP-RIA e BMP-RIB em folículos primordiais, primários e secundários, bem como em oócitos, células da granulosa e da teca de folículos antrais (Silva et al., 2004b).

No tocante aos efeitos das BMPs dos tipos 2 e 4 nos processos reprodutivos, já foi demonstrado que a BMP-4 exerce um papel central na formação das células germinativas primordiais em embriões de camundongos. Em camundongos *knockout* que não expressam BMP-4 observa-se ausência de células germinativas primordiais nas gônadas (Lawson et al., 1999). Além disso, existem evidências de que as BMPs produzidas localmente exercem um papel importante na diferenciação das células gonadotróficas da hipófise (Scully e Rosenfeld, 2002). Já foi demonstrado que o aumento da expressão do antagonista de BMPs, *noggin*, causa uma interrupção no desenvolvimento da hipófise, resultando na ausência de quase todos os tipos de células endócrinas, incluindo as células gonadotróficas que produzem o FSH e o LH (Treier et al., 1998).

Com relação aos efeitos das BMPs em folículos ovarianos, estudos *in vitro* com células da granulosa de ovinos demonstraram que a BMP-2 aumenta a produção de estrógeno e inibina-A após estimulação com FSH, promovendo assim a diferenciação das células da granulosa *in vitro* (Souza et al., 2002). Em humanos foi observado que a BMP-2 aumenta a secreção de inibina-B em células da granulosa cultivadas *in vitro* (Jaatinen et al., 2002). Além disso, a BMP-2 suprime a síntese de estradiol, progesterona e androstenediona e estimula a proliferação de células da teca de suínos (Brankin et al., 2005). Em bovinos, a adição de BMP-2 durante a maturação *in vitro* de complexos cúmulus-oócitos não influencia os processo de expansão das células do cúmulus, de maturação oocitária nem a formação e a qualidade dos blastocistos após fertilização *in vitro* (Fatehi et al., 2005). Estes resultados mostram que a BMP-2 está envolvida nos eventos que antecedem a maturação folicular, tais como síntese de esteróides e inibinas.

Nilsson e Skinner (2003) demonstraram que, *in vitro*, a BMP-4 promove a manutenção da viabilidade e estimula a ativação e crescimento de folículos primordiais de ratas. Em estudos *in vivo* que realizaram a imunização de camundongos com anticorpos anti-BMP-4 foi demonstrado que, após sete dias de tratamento, o peso dos ovários está significativamente reduzido quando comparado com animais controle. Além disso, os autores observaram um aumento no número de folículos primordiais e uma redução da população de folículos primários, confirmando a participação da

BMP-4 na transição de folículos primordiais para o estágio de folículos primários (Tanwar et al., 2008).

Em estudos com folículos antrais foi observado que durante o cultivo de células da granulosa provenientes destes folículos, a BMP-4 potencializa a ação do FSH aumentando a produção de estradiol e inibindo a síntese de progesterona em ratas (Shimasaki et al., 1999) e ovelhas (Mulsant et al., 2001). Em bovinos, a BMP-4 aumenta a produção de estradiol, inibina-A e folistatina após estímulo com IGF-1 e inibe a produção de progesterona em resposta ao IGF-1 (Glister et al., 2004). Para entender como a BMP-4 inibe a produção de progesterona pelas células da granulosa de ovinos, Pierre et al. (2004) demonstraram que a BMP-4 diminui a expressão dos genes regulados pelo AMP cíclico (AMPc), da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) e da enzima de clivagem de cadeia lateral do colesterol P450 (P450 scc). Desta forma, a BMP-4 atua como inibidor da luteinização precoce de células da granulosa de folículos antrais possibilitando o seu crescimento até o estágio de folículo pré-ovulatório (Shimasaki et al., 2004). No tocante aos efeitos da BMP-4 nos estágios finais de maturação oocitária, Fatehi et al. (2005) relataram que a adição de BMP-4 durante a maturação de complexos cúmulo-oócitos *in vitro* não afeta os processos de expansão das células do cúmulo e maturação oocitária, bem como a formação e a qualidade dos blastocistos após fertilização *in vitro*.

Proteínas morfogenéticas óssea-6 (BMP-6)

A BMP-6 é produzida por oócitos, células da granulosa e da teca de vários animais (ratas: Erickson e Shimasaki, 2003; vacas: Glister et al., 2004; ovelhas: Juengel e McNatty, 2005). Para exercer suas funções biológicas, a BMP-6 interage com dois tipos (I e II) de receptores presentes na superfície celular (Massagué e Chen, 2000). Inicialmente, as BMPs ligam-se com receptores do tipo I, ou seja, com o receptor de ativina-IA (ALK-2) ou receptor de BMP-IB. Após a ativação do receptor do tipo I, ocorre o recrutamento do receptor do tipo II (ALK-6), ou seja, receptores de ativina-IIA ou -IIB, ou receptores de BMP-II. A interação entre os receptores induz a fosforilação de mensageiros intracelulares (SMADs), como ocorre na via de sinalização dos BMP-2 e -4 (Massagué, 2000). Recentemente, foi demonstrado que os receptores das BMPs estão expressos em todos os tipos de folículos ovarianos na espécie caprina (Silva et al., 2004a). Em camundongos, também já foi relatada a expressão destes receptores em folículos ovarianos (Shimasaki et al., 2004).

Estudos *in vitro* para avaliar o efeito do BMP-6 sobre o crescimento folicular foram realizados principalmente em camundongos (Otsuka et al., 2001b). Durante o cultivo de células da granulosa de folículos antrais de camundongos foi demonstrado que 100ng/mL de BMP-6 inibe a síntese de progesterona, por meio da inibição de enzimas esteroidogênicas. Além disso, a BMP-6 também inibe a expressão de receptores de LH, mas não altera a produção de estradiol (Otsuka et al., 2001b). Em bovinos, na concentração de 50 ng/mL, a BMP-6 estimula a proliferação das células da granulosa, promove viabilidade celular e aumenta a produção de inibina-A, ativina-A e folistatina em células da granulosa (Glister et al., 2004). É importante ressaltar que a produção de BMP-6 diminui drasticamente durante a seleção do folículo dominante, sendo que esta redução pode estar relacionada com o mecanismo pelo qual os folículos dominantes são selecionados (Shimasaki et al., 2004). Em resumo, a BMP-6 atua retardando o processo de diferenciação folicular, proporcionando o rápido crescimento do folículo por meio da multiplicação das células da granulosa.

Proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7)

A BMP-7 é produzida pelas células da teca de folículos secundários e antrais e exerce suas funções biológicas interagindo com o receptor de ativina-IA (ALK-2) ou receptor de BMP-IB (ALK-6) que, após a ativação, recruta o receptor de ativina-IIA ou de BMP-II (Shimasaki et al., 2004). Com relação aos efeitos *in vivo* da BMP-7, Lee et al. (2001) injetaram BMP-7 (1µg/mL) no interior da bolsa ovariana de ratas e em seguida caracterizaram as alterações na foliculogênese, ovulação e esteroidogênese. Estes autores demonstraram que a BMP-7 reduz o número de folículos primordiais e aumenta o número de folículos primários, secundários e antrais, indicando a BMP-7 promove a ativação e o crescimento dos folículos primordiais. Além disso, a administração da BMP-7 promoveu mitose nas células da granulosa e inibiu a produção de progesterona. Considerando que a progesterona é importante para o processo de ovulação (Yoshimura e Wallach, 1987), a inibição da produção de progesterona pela BMP-7 pode estar relacionada com os mecanismos de inibição da ovulação. Estudos *in vitro*, também demonstraram que a BMP-7, na concentração de 100ng/mL, promove a ativação e crescimento de folículos primordiais, bem como aumenta a expressão de receptores para FSH durante o cultivo de ovários de camundongos (Lee et al., 2004). Durante o cultivo *in vitro* de células da granulosa de rata foi observado que a BMP-7 modula a ação do FSH, no sentido de aumentar a produção de estradiol e inibir a síntese de progesterona (Shimasaki et al., 1999). É bem estabelecido que as células da granulosa de folículos em crescimento respondem ao estímulo do FSH, *in vivo*, produzindo estradiol. Já a produção de progesterona é observada somente no estágio de folículo pré-ovulatório. Por outro lado, quando as células da granulosa são cultivadas *in vitro* observa-se aumento na produção tanto de estradiol como de progesterona em resposta ao estímulo do FSH. Isto sugere que um inibidor da síntese de progesterona, ou seja, um inibidor da luteinização deve estar atuando *in vivo* (Shimasaki et al., 2004). A BMP-7 foi um dos primeiros fatores identificado com ação biológica que promove a inibição da luteinização em células da granulosa (Shimasaki et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que a BMP-7 aumenta a

expressão da enzima P450 aromatase favorecendo a produção de estradiol (Lee et al., 2001).

Proteína morfogenética óssea – 15 (BMP-15)

Estudos recentes têm proposto que a BMP-15 primeiramente liga-se ao receptor BMP tipo IB (ALK-6), e posteriormente ocorre o recrutamento do receptor BMP tipo II (Shimasaki et al., 2004). Em alguns mamíferos já estudados, como roedores, ovinos e em humanos, a BMP-15 mostrou estar expressa a partir de oócitos de folículos primários avançados (Juengel e McNatty, 2005). Já para a espécie caprina, a proteína BMP-15 foi encontrada nos oócitos de todos os tipos de folículos e células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais, mas não em folículos primordiais. Os RNAs mensageiros para BMP-15, BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II foram detectados nos folículos primordiais, primários, secundários, bem como no oócito e células da granulosa de folículos antrais de caprinos (Silva et al., 2004a).

A BMP-15 tem como primeiro alvo as células da granulosa e atua regulando sua proliferação e diferenciação (Otsuka et al., 2000). Estudos *in vitro* têm demonstrado que ela promove a proliferação das células da granulosa e estimula o desenvolvimento de folículos primordiais e primários em roedores, ou seja, é um importante regulador da mitose das células da granulosa e do desenvolvimento folicular inicial (Juengel e McNatty, 2005). Em células da granulosa de ratas, foi mostrado que a BMP-15 recombinante (100 ng/mL) estimulou a proliferação independente do FSH, mas diminuiu os efeitos do FSH no que se refere à produção de progesterona sem afetar a produção de estradiol (Otsuka et al., 2000). A BMP-15 (100 ng/mL) é capaz de estimular a expressão do Kit ligand (KL) nas células da granulosa de ratas (Otsuka e Shimasaki, 2002), além de estimular a expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células do cúmulus de camundongas (Yoshino et al., 2006). A BMP-15 tem um papel essencial nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular (transição de primordial para primário), promovendo proliferação das células da granulosa e prevenindo diferenciação (Galloway et al., 2000). Ele continua expresso ao longo do estágio antral avançado, onde foi sugerido em estudos com ovelhas, que o BMP-15 é requerido para o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios (Juengel et al., 2002).

Fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9)

O GDF-9 é majoritariamente expresso e secretado pelo oócito (Chang et al., 2002). O efeito biológico do GDF-9 ocorre após ligação com dois tipos de receptores, ou seja, BMPR-II e T β R-I (ALK-5 - Vitt et al., 2002; Mazerbourg et al., 2004). O GDF-9 (50ng/mL) atua promovendo o crescimento de folículos primários e a proliferação de células da teca de ratas (Nilson e Skinner, 2002). Na concentração de 200 ng/mL, o GDF-9 exerce efeito sinérgico com o FSH sobre o crescimento e diferenciação de folículos pré-antrais murídeos (Hayashi et al., 1999) e estimula a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa de humanos (Hreinsson et al., 2002). Dong et al. (1996) mostraram que na ausência do GDF-9, não ocorre a formação de folículos secundários, levando conseqüentemente à degeneração dos oócitos inclusos em folículos primários de camundongos. Estudos demonstram também que o GDF-9 estimula a secreção basal de estradiol e progesterona pelas células da granulosa de pequenos folículos antrais de ratas (Vitt et al., 2000). Este fator também estimula a formação e as funções das células da teca, bem como a sua capacidade de produzir andrógenos em ovários de ratas (Vitt et al., 2000). Além disso, o GDF-9 exerce importante função em estágios avançados de desenvolvimento folicular aumentando a produção da cyclooxygenase-2, da proteína reguladora da esteroidogênese aguda (StAR), do ativador do plasminogênio e do receptor do LH (Elvin et al., 1999; Vitt et al., 2000). Adicionalmente, o GDF-9 induz a expansão do cúmulus e promove a maturação oocitária em folículos de camundongas (Elvin et al., 1999). O RNAm para o GDF-9 tem sido localizado em oócito de ovários bovinos, ovinos (Bodensteiner et al., 1999), caprinos (Silva et al., 2004a). A sua expressão em oócitos de folículos primordiais de ovelhas e cabras levantou a possibilidade de que o GDF-9 é essencial para a ativação de folículos primordiais e o seu subsequente desenvolvimento. Juengel et al. (2002) relataram que ovelhas imunizadas contra o GDF-9 tornam-se anovulatórias e seus ovários apresentam poucos folículos além do estágio primário. Em caprinos, o GDF-9 e os seus receptores estão expressos em todas as categorias foliculares (Silva et al., 2004a).

Ativina-A, inibina e follistatina

A ativina-A é formada por duas subunidades β A (β A- β A) de inibina e exerce suas ações biológicas por meio da ligação, inicialmente, com receptores de ativina IIA (ActR-IIA) ou IIB (ActR-IIB). Em seguida, ocorre a formação de um complexo com o receptor de ativina IB (ActR-IB / ALK-4, Pangas et al., 2002). A expressão das proteínas e dos RNAs mensageiros para ativina-A e seus receptores foi demonstrada em oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais em diferentes espécies (caprinos, Silva et al., 2004b; ovinos, Tisdall et al., 1994; bovinos, Hulshof et al., 1997; Izadyar et al., 1998). Estudos *in vitro* demonstraram que a ativina-A associada ao FSH estimula o crescimento de folículos pré-antrais (bovinos, Hulshof et al., 1997; camundongas, Liu et al., 1998) e aumenta a expressão de

receptores para FSH em células da granulosa de ratas (Minegishi et al., 1999). A ativina-A também estimula a maturação oocitária em bovinos (Silva e Knight, 1998) e regula a esteroidogênese em células da granulosa de primatas (Alak et al., 1998). Em ratas, a ativina-A (100ng/mL) estimula a proliferação de células da granulosa e promove a formação de cavidade antral em folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (Zhao et al., 2001). Quando testada em caprinos, a ativina-A (10 ou 100 ng/mL) estimulou a ativação, crescimento e aumentou a porcentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais (Silva et al., 2006). Além disso, a adição de 100 ng/ml de ativina-A reduziu significativamente o número de folículos atresícos em tecido cortical ovariano cultivado. Dessa forma, a ativina-A atua como um fator de sobrevivência e crescimento de folículos inclusos em tecido ovariano, bem como no crescimento, mas não na sobrevivência de folículos primários isolados (Silva et al., 2006).

As inibinas são glicoproteínas diméricas, consistindo de duas subunidades α e β que têm um importante papel na regulação da fertilidade devido a sua ação inibitória sobre a secreção de FSH pela pituitária (Findlay, 1993; Woodruff et al., 1993; Magoffin e Jakimiuk, 1997). A inibina é um antagonista fisiológico da ativina que melhora a produção de andrógenos, induzida pelo LH, em células da teca de bovinos (Wrathal e Knight, 1995). A inibina B é principalmente produzida pelas células da granulosa de folículos antrais pequenos (Welt e Schneyer, 2001), enquanto que a inibina A é produzida por folículos dominantes e corpo lúteo (Welt et al., 1999).

A folistatina é uma glicoproteína monomérica e está estruturalmente relacionada com as ativinas, ligando-se com alta afinidade às subunidades β . Além disso, é também capaz de neutralizar as atividades da ativina em uma grande variedade de tecidos, incluindo o ovário (Beg e Ginther, 2006). Embora a folistatina tenha sido inicialmente caracterizada como uma proteína que liga-se à ativina, também é conhecida por ligar-se com alta afinidade a outros membros da superfamília TGF- β , como a inibina (Shimonaka et al., 1991), e as BMP-4, -6, -7 e -15 (Otsuka et al., 2001a; Amthor et al., 2002; Glistler et al., 2004). A proteína é predominantemente expressa em células da granulosa e no fluido folicular em bovinos (Glistler et al., 2006). E, ainda, esta é secretada pela hipófise de ratas, tendo um efeito inibitório sobre a secreção de FSH (Liu et al., 1996).

Hormônio anti-Mulleriano (AMH)

A proteína precursora do AMH é um homodímero ligado por pontes dissulfeto. Após clivagem proteolítica é produzido um fragmento inativo de 110 kDa e um biologicamente ativo de 25 kDa, oriundo da região C-terminal (Giuli et al., 1997). Similar aos demais fatores da família TGF- β , o AMH inicialmente liga-se a receptores do tipo II (AMHR-II) e forma um complexo com receptores do tipo I (ActR-IA (ALK2) BMPR-IA (ALK3) ou BMPR-IB (ALK6), que são fosforilados. Os receptores do tipo I ativados ligam-se aos SMADs que ingressam no núcleo da células para ativar o promotor dos genes alvos (Massagé e Chen, 2000).

No ovário, evidências indicam o AMH exerce um efeito inibitório na iniciação do crescimento de folículos primordiais (Durlinger et al., 2002b). Em ovários de camundongas recém-nascidas, a exposição *in vitro* ao AMH reduziu o número de folículos em crescimento (Durlinger et al., 2002a). Ao contrário, camundongas sem o gene para o AMH apresentaram um aumento nas taxas de recrutamento de folículos primordiais resultando em uma diminuição prematura na sua reserva ovariana (Durlinger et al., 1999). A expressão do AMH é ausente em folículos primordiais, mas é detectada em células da granulosa de folículos em estágios primários até antrais pequenos, suportando o conceito de que folículos em crescimento exercem um feedback inibitório sobre os folículos primordiais.

Estudos com camundongos transgênicos, que não produzem AMH, demonstraram que o AMH também exerce um papel no controle da sensibilidade dos folículos em crescimento ao FSH. Nestes animais, apesar de baixas concentrações de FSH, os ovários continham um maior número de folículos em desenvolvimento, quando comparado aos animais controle (Durlinger et al., 1999), indicando que o AMH pode inibir o crescimento folicular induzido pelo FSH. Estudos *in vitro*, demonstraram que a adição AMH ao meio de cultivo de folículos pré-antrais de camundongos inibiu o crescimento folicular induzido pelo FSH, especialmente devido a uma redução na proliferação das células da granulosa (Durlinger et al., 2001).

Fator de crescimento transformante- β (TGF- β)

Em mamíferos, a subfamília TGF- β é composta por três isoformas, denominadas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. O RNAm para TGF- β e a proteína têm sido observados nas células da teca e da granulosa, bem como em oócitos de algumas espécies (Nilsson et al., 2003; Bristol e Woodruff, 2004). A distribuição celular precisa dessas isoformas é variável, a qual depende da espécie estudada e do estágio folicular (Juengel e McNatty, 2005). Os receptores para TGF- β são divididos em tipo I (T β RI ou ALK5) e tipo II (T β RII), sendo aparentemente expressos em muitos tipos celulares. O TGF- β pode estimular a expressão de receptores para FSH, amplificar a atividade da aromatase sobre o FSH, a produção de inibina e de progesterona e, ainda, a indução de receptores para LH (Dunkel et al., 1994). Em humanos, o TGF- β 1 foi observado em oócitos de folículos primários e em células da granulosa e da teca de folículos antrais. Em contraste, o TGF- β 2 estava restrito a células da teca de folículos pré-antrais grandes, enquanto que em folículos antrais

a proteína TGF- β 2 foi expressa em células da granulosa e da teca. A expressão da proteína TGF- β 3 não é bem determinada. Em caprinos, a expressão do RNAm para TGF- β 1 e - β 2 foi observada em células da teca de folículos antrais e pré-antrais (Juengel et al., 2004). O RNAm para TGF- β 3 foi observado em oócitos e células da granulosa e da teca de folículos antrais e pré-antrais de ratas (Schmid et al., 1994).

A localização, sítios de ação e efeito biológico de alguns dos principais membros da família TGF- β , como por exemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-15 são ilustrados resumidamente na Tab. 1. A Tab. 2 mostra informações sobre o GDF-9, o AMH e o TGF- β . A localização e as funções de ativina-A, inibina e follistatina estão descritos na Tab. 3.

Tabela 1. Localização, sítio de ação e efeito biológico de BMP-2, -4, -6, -7 e -15 em ovários mamíferos. (CG: células da granulosa).

Fator	Localização	Ação	Efeito
BMP-2	CG / teca	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - estimula a produção de inibina e de estrógeno induzida por FSH em CG
BMP-4	Teca	CG	<ul style="list-style-type: none"> - promove ativação de folículos primordiais - inibe a diferenciação e luteinização promovida pelo FSH em CG - manutenção da viabilidade de folículos e CG
BMP-6	oócito / CG	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - inibe a expressão de receptores para FSH (FSH-R)
BMP-7	Teca	Oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - produção de progesterona promovida pelo FSH - promove ativação de folículos primordiais e crescimento de folículos antrais - inibe a luteinização promovida pelo FSH em CG - inibe a produção de progesterona promovida e aumenta a síntese de estrógeno em CG
BMP-15	Oócito	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - participa do processo de seleção folicular - estimula a proliferação de CG, expressão de KL e atua na ovulação - inibe a expressão de FSH-R, a diferenciação e a produção de progesterona - promove o crescimento do oócito após estimulação com FSH - estimula a expansão do cumulus

Fonte: Dong et al., 1996; Elvin et al., 1999; Mizuzuma et al., 1999; Otsuka et al., 2000, 2001b; Vitt et al., 2000; Yan et al., 2001; Hreinsson et al., 2002; Jaatinen et al., 2002; Nilsson e Skinner, 2002; Otsuka e Shimasaki, 2002; Souza et al., 2002; Shimasaki et al., 2004; Thomas et al., 2005; Guéripel et al., 2006; Shimizu et al., 2006.

Tabela 2. Localização, sítio de ação e efeito biológico do GDF-9, AMH e TGF- β em ovários mamíferos. (CG: células da granulosa).

Fator	Localização	Ação	Efeito
GDF-9	Oócito	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - promove o crescimento de folículos primários e recrutamento de células da teca - estimula manutenção da viabilidade folicular a proliferação de CG - exerce efeito sinérgico com o FSH - inibe expressão de receptores de LH (LH-R), síntese de progesterona e estrógeno, mas - estimula a produção de inibina. Inibe a diferenciação folicular induzida por FSH - participa da ovulação regulando a expansão do cumulus e liberação do oócito - promove a sobrevivência e crescimento folicular durante a transição de folículos pré-antrais para antrais iniciais, através da supressão da apoptose e da atresia folicular - atua na expansão do cumulus
AMH	CG	oócito / CG	<ul style="list-style-type: none"> - inibe a ativação de folículos primordiais - reduz a sensibilidade de folículos antrais ao FSH
TGF- β	CG	oócito / teca	<ul style="list-style-type: none"> - inibe a atividade da aromatase em CG, reduzindo a produção de E2 - promove o crescimento folicular - promove a síntese de inibina e estradiol

Fonte: Xiao et al., 1992; Findlay, 1993; Li et al., 1995; De Winter et al., 1996; Yokota et al., 1997; Liu et al., 1998, 1999; Durlinger et al., 1999, 2000, 2002; Lee et al., 2001; Gui e Joyce, 2005; Orisaka et al., 2006; Wang e Roy, 2006.

Tabela 3. Localização, sítio de ação e efeito biológico da ativina, inibina e folistatina em ovários mamíferos. (CG: células da granulosa).

Fator	Localização	Ação	Efeito
Ativina	Oócito / CG	oócito / CG / teca	<ul style="list-style-type: none"> - estimula o crescimento de folículos pré-antrais - aumenta a expressão de FSH-R bem como a de LH-R induzida por FSH e promove - maturação oocitária - regula a esteroidogênese em CG e reduz a produção de andrógenos em células da - teca - induz a expressão dos receptores de estrógeno
Inibina A	CG	oócito / CG / teca	<ul style="list-style-type: none"> - estimula a produção de andrógenos em células da teca - antagoniza a ação da ativina e possivelmente dos BMPs - regula a secreção de FSH endógeno durante o início da gestação
Folistatina	Oócito / CG	oócito / CG / teca	<ul style="list-style-type: none"> - liga-se a ativina de forma quase que irreversível e a neutraliza - antagoniza ação biológica do BMP-15

Fonte: Xiao et al., 1992; Findlay, 1993; Li et al., 1995; De Winter et al., 1996; Yokota et al., 1997; Liu et al., 1998, 1999; Durlinger et al., 1999, 2000, 2002; Lee et al., 2001; Gui e Joyce, 2005; Wang e Roy, 2006; Orisaka et al., 2006.

Receptores para os fatores da superfamília TGF- β

A maioria dos membros da superfamília TGF- β exercem seus efeitos sobre as células-alvo através da formação de um complexo com dois tipos de receptores localizados na superfície das células, designados de Tipo-I e Tipo-II (Massagué e Wotton, 2000; Chang et al., 2002; Miyazawa et al., 2002). Em mamíferos, foram identificados sete receptores tipo-I e cinco tipo-II (De Caestecker, 2004; Ten Dijke e Hill, 2004). A ativação desses receptores através da fosforilação dos seus domínios intracelulares leva a fosforilação de moléculas sinalizantes, chamadas Smads, que são deslocadas para o núcleo, onde regulam a expressão de genes específicos através de interações com vários fatores de transcrição co-ativadores e co-repressores (Knight e Glister, 2006). Múltiplas associações parecem ocorrer entre os subtipos de receptores e, portanto, um grande número de complexos com sinalização específica é possível (Ten Dijke et al., 2003; Shimasaki et al., 2004). Geralmente, ligações entre membros da família TGF- β e ativina ocorrem através de receptores tipo II, enquanto os membros da família BMP têm alta afinidade por receptores tipo I. (Shi e Massague, 2003; Ten Dijke et al., 2003; De Caestecker, 2004). Um terceiro tipo de receptor, chamado TGF- β RIII tem sido identificado. Em alguns casos, este facilita a ligação entre o TGF- β 2 ao receptor tipo II e, ainda, melhora a associação da inibina com o receptor tipo II da ativina antagonizando, assim, suas ações (Gray et al., 2002) e de uma série de BMPs (Wiater e Vale, 2003).

Os tipos de receptores para os principais fatores desta família bem como a sua localização são mostrados na Tab. 4.

 Tabela 4. Localização dos receptores para os principais fatores de crescimento da família TGF- β .

Fator	Tipo 2 / localização	Tipo 1/ Localização	Referência
BMP-2	BMPR-II / oócito, CG	BMPR-IA (ALK3) / oócito, CG	(Shimasaki et al., 1999)
BMP-4		BMPR-IB (ALK6) / oócito, CG	(Erickson e Shimasaki, 2003)
BMP-6	BMPR-II / oócito, CG	ActR-IA (ALK2) / oócito, CG	(Sidis et al., 1998)
BMP-7	ActR-IIA / oócito, CG ActR-IIB / oócito, CG	BMPR-IB (ALK6) / oócito, CG	(Drummond et al., 2002) (Knight e Glister, 2003)
BMP-15	BMPR-II / oócito, CG	BMPR-IB (ALK6) / oócito, CG	(Erickson e Shimasaki, 2003; Shimasaki et al., 2004)
GDF-9	BMPR-II / oócito, CG	T β R-I (ALK5) / oócito	(Erickson e Shimasaki, 2003; Vitt et al., 2002; Mazerbourg et al., 2004)
AMH	AMHR-II / oócito, CG, teca	ActR-IA (ALK2) / oócito, CG BMPR-IA (ALK3) / oócito, CG BMPR-IB (ALK6) / oócito, CG	(Erickson e Shimasaki, 2003) (Shimasaki et al., 2004)
Ativina	ActR-IIA / oócito, CG ActR-IIB / oócito, CG	ActR-IB (ALK4) / oócito, CG, teca	(Drummond et al., 2002) (Pangas et al., 2002)



Considerações finais

Esta revisão de literatura destaca a participação dos vários fatores de crescimento, pertencentes à superfamília TGF- β , que podem atuar isoladamente ou combinados, modulando o efeito de hormônios sobre a foliculogênese em ovários mamíferos. O crescimento folicular é regulado por uma complexa interação desses fatores de crescimento com as gonadotrofinas. A elucidação desses sistemas de controle consiste em um dos maiores desafios para melhorar a compreensão dos processos envolvidos na foliculogênese ovariana e, conseqüentemente, para o fornecimento de oócitos viáveis e maduros que poderão ser destinados a diferentes biotécnicas da reprodução animal.

Referências

- Alak BM, Coskun S, Friedman CI, Kennard EA, Kim MH, Seifer DB.** Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Fertil Steril*, v.70, p.1126-1130, 1998.
- Amthor H, Christ B, Rashid-Doubell F, Kemp CF, Lang E, Patel K.** Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. *Dev Biol*, v.243, p.115-127, 2002.
- Beg MA, Ginther OJ.** Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, v.132, p.365-377, 2006.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR.** Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod*, v.60, p.381-386, 1999.
- Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG.** Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary. *Domest Anim Endocrinol*, v.28, p.367-379, 2005.
- Bristol SK, Woodruff TK.** Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor beta superfamily ligands in the feline ovary. *Biol Reprod*, v.70, p.846-859, 2004.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*, v.23, p.787-823, 2002.
- Cortvrindt R, Smitz JEJ.** In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.3-9, 2001.
- De Caestecker M.** The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, v.15, p.1-11, 2004.
- De Winter JP, Ten Dijke P, De Vries CJ, Van Achterberg TA, Sugino H, De Waele P, Huylebroeck D, Verschuere K, Van Den Eijnden-Van Raaij AJ.** Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol*, v.116, p.105-114, 1996.
- Dong J, Albertine DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.** Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v.383, p.531-535, 1996.
- Drummond AE, Dyson M, Le MT, Ethier JF, Findlay JK.** Ovarian follicle populations of the rat express TGF-beta signalling pathways. *Mol Cell Endocrinol*, v.202, p.53-57, 2003.
- Drummond AE, Le MT, Ethier JF, Dyson M, Findlay JK.** Expression and localization of activin receptors, Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology*, v.43, p.1423-1433, 2002.
- Dunkel L, Tilly JL, Shikone T, Nishimori K, Hsueh AJ.** Follicle stimulating hormone receptor expression in the rat ovary: increases during prepubertal development and regulation by the opposing actions of transforming growth factors beta and alpha. *Biol Reprod*, v.50, p.940-948, 1994.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP.** Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, v.143, p.1076-1084, 2002a.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen APN.** Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* v.142, p.4891-4899, 2001.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, De Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP.** Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, v.140, p.5789-5796, 1999.
- Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP.** Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*, v.124, p.601-609, 2002b.
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk M.** Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol*, v.13, p.1035-1048, 1999.
- Erickson GF, Shimasaki S.** The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.9, 2003.
- Fatehi AN, van den Hurk R, Colenbrander B, Daemen AJ, van Tol HT, Monteiro RM, Roelen BA, Bevers MM.** Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of

- effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, v.63, p.872-889, 2005.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. In: Gonsalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo, SP: Varela. 2002. p.227-260.
- Findlay JK.** An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod*, v.48, p.15-23, 1993.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luuro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davies GH, Ritvos O.** Mutations in an oocytederived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, v.25, p.279-283, 2000.
- Giulli G, Shen WH, Ingraham HA.** The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development*, v.124, p.1799-1807, 1997.
- Glister C, Groome NP, Knight PG.** Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *J Endocrinol*, v.188, p. 215-225, 2006.
- Glister C, Kemp CF, Knight PG.** Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*, v.127, p.239-254, 2004.
- Gray PC, Bilezikjian LM, Vale W.** Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for β glycan. *Mol Cell Endocrinol*, v.188, p.254-260, 2002.
- Guéripel X, Brun V, Gougeon A.** Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. *Biol Reprod*, v.75, p. 836-843, 2006.
- Gui LM, Joyce IM.** RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol Reprod*, v.72, p.195-199, 2005.
- Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ.** Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, v.140, p.1236-1244, 1999.
- Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh ALW, Hovatta O.** Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, p.316-321, 2002.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Bekers JF, Bevers MM, Vanderstichele H, Van Den Hurk R.** Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A in vitro. *Theriogenology*, v.48, p.133-142, 1997.
- Izadyar F, Dijkstra G, Van Tol HTA, Van Den Eijnden-Van Raaij AJM, Van Den Hurk R, Colenbrander B, Bevers MM.** Immunohistochemical localization and mRNA expression of activin, inhibin, follistatin, and activin receptor in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev*, v.49, p.186-195, 1998.
- Jaatinen R, Bondestam J, Raivio T, Hilden K, Dunkel L, Groome N, Ritvos O.** Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin beta(B)-subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, p.1254-1261, 2002.
- Johnson AL.** Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.185-201, 2003.
- Juengel JL, Bibby AH, Reader KL, Lun S, Quirke LD, Haydon LJ, McNatty KP.** The role of transforming growth factor- β (TGF- β) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod Biol Endocrinol*, v.2, p.78-88, 2004.
- Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP.** Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod*, v.67, p.1777-1789, 2002.
- Juengel JL, McNatty KP.** The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update*, v.11, p.143-160, 2005.
- Knight PG, Glister C.** Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.165-183, 2003.
- Knight PG, Glister C.** TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, v.132, p.191-206, 2006.
- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, et al.** Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*, v.13, p.424-436, 1999.
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S.** Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod*, v.65, p.994-999, 2001.
- Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SH, Shimasaki S, Lee S, Lee KA.** Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev*, v.69, p.159-163, 2004.
- Li R, Phillips DM, Mather JP.** Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology*, v.136, p.849-

856, 1995.

Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology*, v.140, p.2480-2485, 1999.

Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v.139, p.2342-2347, 1998.

Liu ZH, Shintani Y, Sakamoto Y, Harada K, Zhang CY, Fujinaka Y, Abe M, Goto T, Saito S. Effects of LHRH, FSH and activin A on follistatin secretion from cultured rat anterior pituitary cells. *Endocr J*, v.43, p.321-327, 1996.

Magoffin DA, Jakimiuk AJ. Inhibin A, inhibin B and activin A in the follicular fluid of regularly cycling women. *Hum Reprod*, v.12, p.1714-1719, 1997.

Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, v.123, p.23-30, 2002.

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev*, v.14, p.627-644, 2000.

Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*, v.19, p.1745-1754, 2000.

Mazerbourg S, Klein C, Roh J, Kaivo-Oja N, Mottershead DG, Korchynskiy O, Ritvos O, Hsueh AJW. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol Endocrinol*, v.18, p.653-665, 2004.

Minegishi T, Kishi H, Tano M, Kameda T, Hirakawa T, Miyamoto K. Control of FSH receptor mRNA expression in rat granulosa cells by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate, activin, and follistatin. *Mol Cell Endocrinol*, v.149, p.71-77, 1999.

Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two Major Smad pathways in TGF-b superfamily signalling. *Genes Cells*, v.7, p.1191-1204, 2002.

Mizunuma H, Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Yokota H, Ibuki Y, Hasegawa Y. Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology*, v.140, p.37-42, 1999.

Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.98, p.5104-5109, 2001.

Nilsson EE, Doraiswamy V, Skinner MK. Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev*, v.66, p.237-246, 2003.

Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*, v.69, p.1265-1272, 2003.

Nilsson EE, Skinner MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod*, v.67, p.1018-1024, 2002.

Orisaka M, Orisaka S, Jiang J, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. Growth Differentiation Factor-9 Is Anti-Apoptotic during Follicular Development from Preantral to Early Antral Stage. *Mol Endocrinol*, v. 20, p.2456-2468, 2006.

Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun*, v.289, p.961-966, 2001a.

Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem*, v.276, p.32889-32895, 2001b.

Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.8060-8065, 2002.

Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*, v.275, p.39523-39528, 2000.

Pangas SA, Rademaker AW, Fishman DA, Woodruff TK. Localization of the activin signal transduction components in normal human ovarian follicles: implications for autocrine and paracrine signaling in the ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, p.2644-2657, 2002.

Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Mandon-Pepin B, Monniaux D, Monget P, Fabre S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *J Mol Endocrinol*, v.33, p.805-817, 2004.

Saumande J. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec Med Vet*, v.167, p.205-218, 1991.

Schmid P, Cox D, van der Putten H, McMaster GK, Bilbe G. Expression of TGF-beta and TGF-beta type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: stored maternal TGF-beta 2 message in oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, v.201, p.649-656, 1994.

Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*, v.295, p.2231, 2002.

Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-b signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, v.113, p.685-700, 2003.

- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF.** The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, v.25, p.72-101, 2004.
- Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF.** A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.96, p.7282-7287, 1999.
- Shimizu T, Jayawardana BC, Nishimoto H, Kaneko E, Tetsuka M, Miyamoto A.** Involvement of the bone morphogenetic protein/receptor system during follicle development in the bovine ovary: Hormonal regulation of the expression of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) and its receptors (ActRII and ALK-2). *Mol and Cell Endocrinol*, v.249, p.78-83, 2006.
- Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N.** Follistatin binds to both activin and inhibin through the common beta subunit. *Endocrinology*, v.128, p.3313-3315, 1991.
- Sidis Y, Fujiwara T, Leykin L, Isaacson K, Toth T, Schneyer AL.** Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes. *Biol Reprod*, v.59, p.807-812, 1998.
- Silva CC, Knight PG.** Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.58, p.558-565, 1998.
- Silva JRV, Tharasanit T, Taverne MAM, Van Der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR, Van Den Hurk R.** The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J Endocrinol*, v.189, p.113-125, 2006.
- Silva JRV, Van Den Hurk R, Matos MHT, Santos RR, Pessoa C, Moraes MO, Figueiredo JR.** Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1691-1704, 2004a.
- Silva JRV, Van Den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.11-19, 2004b.
- Souza CJ, Campbell BK, Mcneilly AS, Baird DT.** Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction*, v.123, p.363-369, 2002.
- Tanwar PS, O'Shea T, McFarlane JR.** In vivo evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary. *Anim Reprod Sci*, v.106, p.232-40, 2008.
- Ten Dijke P, Hill CS.** New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem Sci*, v.29, p.265-273, 2004.
- Ten Dijke P, Korchynskiy O, Valdimarsdottir G, Goumans MJ.** Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol*, v.211, p.105-113, 2003.
- Ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzen P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH.** Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin. *Science*, v.264, p.101-104, 1994.
- Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, Vanderhyden BC.** Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology*, v.146, p.941-949, 2005.
- Tisdall DJ, Hudson N, Smith P, McNatty KP.** Localization of ovine follistatin and alpha and beta A inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol*, v.12, p.181-193, 1994.
- Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG.** Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev*, v.12, p.1691-1704, 1998.
- Van Den Hurk R, Zhao J.** Formation of ovarian follicle and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.
- Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ.** Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod*, v.62, p.370-377, 2000.
- Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ.** Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod*, v.67, p.473-480, 2002.
- Wang C, Roy SK.** Expression of Growth Differentiation Factor 9 in the Oocytes Is Essential for the Development of Primordial Follicles in the Hamster Ovary. *Endocrinology*, v.147, p.1725-1734, 2006.
- Welt CK, Adams JM, Sluss PM, Hall JE.** Inhibin A and inhibin B responses to gonadotropin withdrawal depends on stage of follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, p.2163-2169, 1999.
- Welt CK, Schneyer AL.** Differential regulation of inhibin B and inhibin a by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, v.86, p.330-336, 2001.
- Wiater E, Vale W.** Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem*, v.278, p.7934-7941, 2003.
- Woodruff TK, Krummen LA, Lyon RJ, Stocks DL, Mather JP.** Recombinant human inhibin A and recombinant human activin A regulate pituitary and ovarian function in the adult female rat. *Endocrinology*, v.132, p.2332-2341, 1993.
- Wrathall JH, Knight PG.** Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *J Endocrinol*, v.145, p.491-500, 1995.
- Xiao S, Robertson DM, Findley JK.** Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein /



follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, v.131, p.1009-1016, 1992.

Yan C, Wang P, Demayo J, Demayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*, v.15, p.854-866, 2001.

Yokota H, Yamada K, Liu X, Kobayashi J, Abe Y, Mizunuma H, Ibuki Y. Paradoxical action of activin A on folliculogenesis in immature and adult mice. *Endocrinology*, v.138, p.4572-4576, 1997.

Yoshimura Y, Wallach EE. Studies of the mechanism(s) of mammalian ovulation. *Fertil Steril*, v.47, p.22-34, 1987.

Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *PNAS*, v.103, p.10678-10683, 2006.

Zhao J, Taverne MA, Van Der Weijden GC, Bevers MM, Van Den Hurk R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localisation of activin A and activin receptor II. *Biol Reprod*, v.65, p.967-977, 2001.
