



## **Papel da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e Kit Ligand (KL) na regulação da foliculogênese em mamíferos**

*Role of Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) and Kit Ligand (KL) in the regulation of folliculogenesis in mammalian*

**I.M.T. Lima<sup>1</sup>, J.J.H. Celestino, J.R. Figueiredo, A.P.R. Rodrigues**

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Foliculos Ovarianos Pré-Antrais  
LAMOFOPA - Universidade Estadual do Ceará (UECE), 60740-000, Fortaleza, Ceará

<sup>1</sup>Correspondência: [dora.uece@gmail.com](mailto:dora.uece@gmail.com)

### **Resumo**

A foliculogênese é coordenada por diversos fatores de crescimento e hormônios responsáveis por garantir o sucesso do desenvolvimento folicular e oocitário. Para a obtenção de oócitos competentes, é necessária uma perfeita interação entre as células somáticas foliculares e o oócito, sendo esta potencialmente regulada por fatores parácrinos produzidos no ovário. Dentre estes fatores, destacam-se a BMP-15 e o KL, sintetizados pelo oócito e pelas células da granulosa, respectivamente. Este artigo revisa o importante papel da BMP-15 e do KL na foliculogênese, enfocando suas características, sítios de expressão, receptores e vias de sinalização, bem como a interação entre estas duas substâncias.

**Palavras-chave:** BMP-15, KL, foliculogênese, ovário.

### **Abstract**

*Folliculogenesis is coordinated by many growth factors and hormones responsible for ensuring the success of follicular and oocyte development. To obtain competent oocytes is necessary to have a perfect interaction between follicular somatic cells and the oocyte, which is potentially regulated by paracrine factors produced in the ovary. Among these factors, we highlight BMP-15 and KL, synthesized by the oocyte and granulosa cells, respectively. This article reviews the important role of BMP-15 and KL in folliculogenesis, focusing on their characteristics, sites of expression, receptors and signaling pathways, as well as the interaction between these two substances.*

**Keywords:** BMP-15, KL, folliculogenesis, ovary.

### **Introdução**

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário e consiste de um oócito circundado por uma ou mais camadas de células somáticas (Knight e Glister, 2006). Durante a foliculogênese, processo que corresponde à formação e ao desenvolvimento de folículos primordiais até o estágio pré-ovulatório, a morfologia folicular é alterada, sendo verificados o crescimento do oócito e a multiplicação e diferenciação de suas células circundantes (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Como consequência, os oócitos inclusos nos folículos em desenvolvimento se tornam progressivamente maduros e competentes para garantir o sucesso dos fenômenos de ovulação e fertilização (Hutt et al., 2006b).

Nos estágios iniciais da foliculogênese, fatores de crescimento produzidos localmente, tais como a Ativina, o Kit Ligand, o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e as Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs), exercem um papel determinante na manutenção da viabilidade e do crescimento folicular. Após a formação do antro, os folículos tornam-se progressivamente dependentes das gonadotrofinas, e os fatores de crescimento locais atuam inibindo ou potencializando a ação destes hormônios (Fortune, 2003). Adicionalmente, evidências indicam que as interações parácrinas entre o oócito e as células somáticas mediadas pelos fatores de crescimento são cruciais para assegurar o perfeito desenvolvimento destes dois tipos celulares ao longo da foliculogênese (Eppig, 2001; Eppig et al., 2002; Matzuk et al., 2002).

Dentre os fatores de crescimento, destacam-se a Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e o Kit Ligand (KL), os quais são considerados importantes fatores intraovarianos relacionados à foliculogênese em mamíferos. A BMP-15 é secretada pelo oócito e apresenta um significativo papel mitogênico sobre as células da granulosa, contribuindo positivamente para o desenvolvimento folicular durante as fases iniciais e finais da foliculogênese (Otsuka et al., 2000; Juengel et al., 2004). O KL, por sua vez, é expresso nas células da granulosa e tem sido implicado na migração, proliferação e sobrevivência de células germinativas primordiais (Zama et al., 2005), na proliferação das células da granulosa (Otsuka e Shimasaki, 2002), no crescimento e sobrevivência do oócito (Jin et al., 2005) e na ativação de folículos primordiais (Parrott e Skinner, 1999), dentre outras funções. Ambos os fatores de crescimento, quando inativados por mutações, têm afetado negativamente o

desenvolvimento folicular e a fertilidade de espécies mamíferas, incluindo ovinos e camundongos (Driancourt et al., 2000; Galloway et al., 2000).

Dentro desse contexto, a presente revisão abordará aspectos relacionados à foliculogênese, população e atresia folicular, enfatizando o papel da BMP-15 e do KL nestes processos, bem como suas características estruturais, sítios de expressão, receptores e vias de sinalização celular. Além disso, nesta revisão, serão também descritos os efeitos resultantes das interações entre BMP-15 e KL, caracterizando esta importante comunicação entre oócito e células da granulosa.

### Foliculogênese

Em mamíferos, os estágios iniciais do desenvolvimento folicular são caracterizados pela migração de células germinativas primordiais a partir do saco vitelínico para a gônada primitiva, com sua posterior colonização (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Nas gônadas, as células germinativas primordiais multiplicam-se ativamente por mitose e diferenciam-se em oogônias, as quais adquirem um maior número de organelas intracelulares (Abir et al., 2006) e passam a ser denominadas oócitos primários após o início da primeira divisão meiótica (Suh et al., 2002). Em seguida, uma camada de células somáticas planas, também conhecidas como células da pré-granulosa, originárias do mesonefro e/ou epitélio ovariano (McNatty et al., 2000; Juengel et al., 2002c), circundam os oócitos primários, formando os folículos primordiais, e iniciando, assim, a foliculogênese (Eppig et al., 2004).

A foliculogênese pode ser definida como o processo contínuo de formação, crescimento e maturação folicular, tendo início com a gênese do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (Van den Hurk e Zhao, 2005). De acordo com o estágio de desenvolvimento, os folículos ovarianos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, de transição, primários e secundários e b) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários, de De Graaf ou pré-ovulatórios (Silva et al., 2004a). Os folículos primordiais constituem o reservatório de folículos quiescentes, representando a maioria (95%) da população folicular presente no ovário mamífero. O início do crescimento dos folículos primordiais, processo denominado ativação (McLaughlin e McIver, 2009), caracteriza-se pelo crescimento oocitário, pela multiplicação das células da granulosa e pela transformação da morfologia dessas células da forma pavimentosa para a forma cúbica (Skinner, 2005). A transição do estágio primordial para primário pode ser prolongada, e folículos com células da granulosa de morfologia pavimentosa e cúbica são frequentemente observados, sendo classificados como folículos de transição (Silva et al., 2004a).

Os folículos primários contêm uma única camada de células da granulosa com morfologia cúbica circundando o oócito. Nesse tipo de folículo, as células da granulosa aumentam em número e tornam-se mais volumosas (Van den Hurk et al., 1997), culminando com o desenvolvimento dos chamados folículos secundários (Picton et al., 1998). Tais folículos são caracterizados pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas localizadas em torno do oócito, bem como pela formação de uma camada de células tecaais envolvendo a membrana basal folicular (Van den Hurk e Zhao, 2005). Estas células da teca são recrutadas a partir do estroma ovariano sob o estímulo de fatores de crescimento parácrinos, tais como o KL e o Fator de Crescimento Fibroblástico básico (FGFb), os quais são sintetizados pelas células da granulosa e pelo oócito, respectivamente, e apresentam atuação mútua neste processo (Knight e Glister, 2006).

Após o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro. A partir desse estágio, os folículos passam a ser denominados antrais ou cavitários. Os grandes folículos antrais geralmente possuem diâmetro acima de 3 mm e contêm células da granulosa, diferenciadas em células do *cumulus* e células murais, muitas camadas de células da teca e um grande espaço contendo líquido folicular, além do oócito. O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (van den Hurk e Zhao, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como para manutenção da fertilidade (Drummond, 2006).

### População e atresia folicular

Em muitos mamíferos, a população folicular ovariana é estabelecida ainda na vida intrauterina (primatas e ruminantes; Knight e Glister, 2006) ou em um curto período de tempo após o nascimento (roedores) (Ojeda et al., 2000). Por outro lado, pesquisas têm demonstrado os mecanismos envolvidos na formação de novas células germinativas e de folículos em mulheres (Bukovsky et al., 2004) e camundongas adultas (Johnson et al., 2004), resultantes da atuação de células-tronco possivelmente presentes na superfície do epitélio ovariano.

Independente da formação de novos folículos na fase adulta, a quantidade total de folículos presentes no ovário mamífero difere entre espécies e indivíduos (Katska-Ksiazkiewicz, 2006), observando-se, aproximadamente, 1.500 folículos na camundonga (Shaw et al., 2000), 235.000 na vaca (Betteridge et al., 1989), 33.000 na ovelha (Amorim et al., 2000), 35.000 na cabra (Lucci et al., 1999) e em torno de 2.000.000 na mulher (Erickson, 1986). Apesar da grande população folicular existente no ovário, a quase totalidade dos folículos (99,9%) não chega até a ovulação, pois morre por um processo natural denominado atresia, o qual ocorre por via apoptótica ou pelo processo degenerativo de necrose (Van Cruchten e Van den Broeck, 2002).

A apoptose ou morte celular programada é um processo determinado geneticamente que depende da expressão de genes pró e antiapoptóticos e tem como característica marcante a fragmentação do DNA a cada 180-200 pares de base (Hussein, 2005). De acordo com o estímulo inicial, a apoptose pode ocorrer por intermédio de receptores de superfície celular (receptores de morte), constituindo a via extrínseca, ou ainda por meio da mitocôndria, constituindo esta a via intrínseca (Joza et al., 2002; Elmore, 2007). Independente da via, duas famílias importantes regulam o processo apoptótico: a família das caspases, consideradas as executoras principais da via apoptótica, e a família Bcl-2, a qual compreende tanto membros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) quanto membros pró-apoptóticos (Bax, Bid, Bik; Hussein, 2005; Greenfield et al., 2007).

Já no que se refere ao processo degenerativo de necrose, este é iniciado por uma perda da homeostase celular e é caracterizado pela lise e desintegração da célula (Bras et al., 2005). Em geral, a necrose é iniciada por mecanismos não celulares como isquemia, deficiência na concentração de ATP (Bathia, 2004) e traumas, levando a danos irreversíveis na célula (McCully et al., 2004). Além disso, trabalhos têm sugerido que mecanismos “ativos”, como uma sobrecarga de  $\text{Na}^+$ , acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  e mudanças na permeabilidade da mitocôndria, podem também participar e levar ao processo necrótico (Padanilam, 2003).

Independente da via efetora, apoptótica ou degenerativa (necrose), a atresia é observada em qualquer estágio do desenvolvimento folicular, sendo, no entanto, predominante na fase antral (Markström et al., 2002). Além de ser regulada por fatores endócrinos, como os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), fatores parácrinos também influenciam na decisão da morte celular durante a foliculogênese. Segundo Jin et al. (2005), o KL é capaz de inibir a apoptose nos oócitos de folículos primordiais por meio do aumento na expressão de proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2 e a Bcl-xL. Outros estudos têm demonstrado ainda que o KL previne a ocorrência de sinais de degeneração em oócitos de folículos pré-antrais após cultivo *in vitro* (Klinger e De Felici, 2002). Trabalhos utilizando a BMP-15, por sua vez, também têm verificado seu importante papel na prevenção da atresia em células somáticas foliculares (Hussein et al., 2005; Yoshino et al., 2006).

Tendo em vista a importância da BMP-15 e do KL no controle da atresia e do desenvolvimento folicular, será feita a seguir uma abordagem mais detalhada acerca da atuação de tais fatores nestes processos.

### Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15)

#### Características estruturais e sítios de expressão da proteína BMP-15

A proteína BMP-15, também conhecida como Fator de Crescimento e Diferenciação 9B (GDF-9B), corresponde a um dos 35 membros da superfamília TGF- $\beta$ , a qual é composta pelo hormônio antimülleriano (AMH) e pelos constituintes das subfamílias TGF- $\beta$ , ativina/inibina, GDF, GDNF e BMP, sendo esta última formada por aproximadamente 20 membros (BMP-1, -2, -3, -4, -6, -7 e -15, dentre outros; Knight e Glister, 2006). Uma característica comum da maioria dos ligantes da superfamília TGF- $\beta$  é a presença de sete resíduos de cisteína conservada, dentre os quais seis estão envolvidos na formação de uma estrutura tridimensional conhecida como “nó de cisteína”. O resíduo não envolvido na constituição desta estrutura forma uma ponte bissulfídica entre duas subunidades, resultando na formação de um dímero ligado covalentemente (Vitt et al., 2001; Fig. 1). A BMP-15, de modo interessante, apresenta apenas seis das sete cisteínas conservadas, sendo privada do quarto resíduo de cisteína, responsável pela dimerização das subunidades (Dube et al., 1998). Essa característica, contudo, não interfere na formação de estruturas diméricas da proteína, visto que as subunidades podem também interagir por meio de ligações do tipo não covalente (Liao et al., 2003).

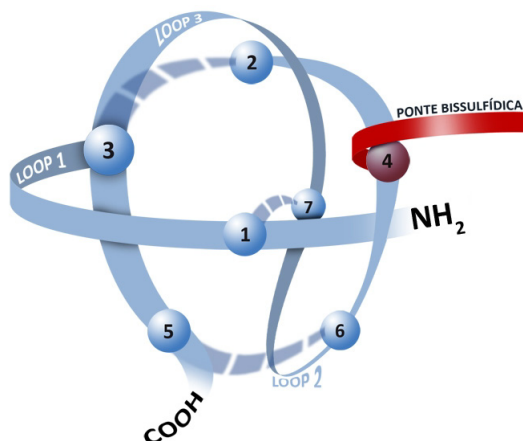


Figura 1. Esquema ilustrando o nó de cisteína e a ponte bissulfídica da maioria dos membros da superfamília TGF- $\beta$ . Note os seis resíduos de cisteína conservada (1, 2, 3, 5, 6 e 7) envolvidos na formação do nó de cisteína (estrutura tridimensional) e o resíduo 4 implicado na formação da ponte bissulfídica responsável pela constituição de dímeros ligados covalentemente.

A BMP-15, como os demais membros da superfamília TGF- $\beta$ , é traduzida como uma pré-proteína composta de um sinal peptídico, uma pró-região e uma região madura, sendo esta última dotada dos resíduos de cisteína (Dube et al., 1998; Juengel e McNatty, 2005). Após a remoção do sinal peptídico, a pró-proteína sofre dimerização e é posteriormente clivada por enzimas proteolíticas em um sítio específico (RXXR), resultando na geração da proteína madura bioativa (Shimasaki et al., 2004; Fig. 2). Durante a dimerização, a região madura da BMP-15 pode se ligar a outra molécula idêntica, formando homodímeros, ou a um outro membro da superfamília TGF- $\beta$ , caracterizando a formação de heterodímeros. Tal informação foi de fato demonstrada por Liao et al. (2003), os quais verificaram a formação de homodímeros e heterodímeros da BMP-15 e do Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9) em linhas celulares transfectadas.

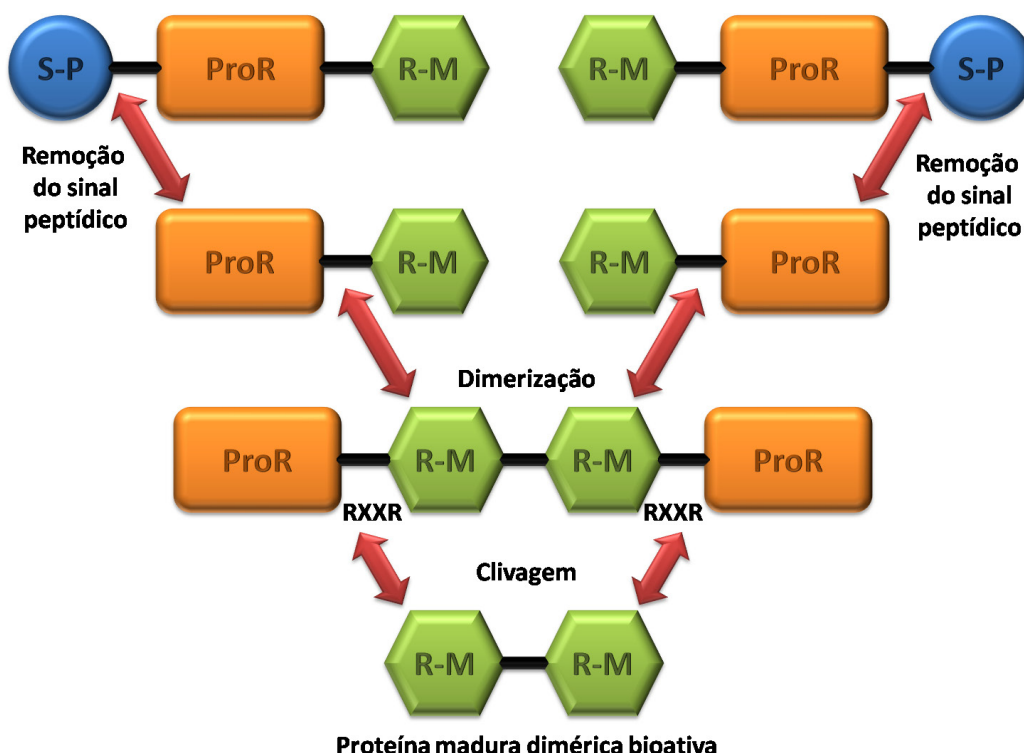


Figura 2. Estrutura e dimerização da BMP-15. A BMP-15 apresenta-se inicialmente como uma pré-proteína dotada de um sinal peptídico (S-P), uma pró-região (ProR) e uma região madura (R-M). Após a remoção do S-P, ocorre a dimerização da pró-proteína através de ligações não-covalentes entre as R-M das subunidades. Em seguida, enzimas proteolíticas clivam a pró-proteína no sítio RXXR, separando a ProR da R-M, o que resulta na formação da proteína madura dimérica bioativa.

No ovário da maioria das espécies, a proteína e o RNAm para a BMP-15 são encontrados exclusivamente no oócito (Laitinen et al., 1998; Eckery et al., 2002; Juengel et al., 2002a), sugerindo esta estrutura como fonte primária da BMP-15 neste órgão. A proteína foi primeiramente observada nos oócitos de folículos primários de ovinos (Galloway et al., 2000), humanos (Aaltonen et al., 1999), ratos (Jaatinen et al., 1999) e camundongos (Laitinen et al., 1998) e em folículos primordiais de pequenos marsupiais (Eckery et al., 2002). Em caprinos, a presença da BMP-15 foi mostrada nos oócitos de todas as categorias foliculares, bem como nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais (Silva et al., 2004b). Além do ovário, o RNAm para a BMP-15 já foi identificado na hipófise (Otsuka e Shimasaki, 2002) e *rete testis* (Aaltonen et al., 1999; Galloway et al., 2000) de algumas espécies, indicando possíveis ações desta proteína em outros órgãos e sistemas.

#### Receptores e vias de sinalização celular da BMP-15

A maioria dos membros da superfamília TGF- $\beta$ , com exceção da subfamília do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e da inibina, exerce seus efeitos sobre as células-alvo por meio da ligação com dois receptores serina/treonina quinase presentes na superfície celular, denominados de receptores Tipo I e Tipo II (Chang et al., 2002). Até o presente momento, sete receptores Tipo I e cinco receptores Tipo II já foram identificados em mamíferos. Dentre estes, o ALK-6 (quinase do tipo receptor de ativina 6 - Tipo I) e o BMPRII (Tipo II) têm sido caracterizados como os receptores de maior afinidade para a BMP-15 (Moore e Shimasaki, 2005; Knight e Glistler, 2006). Em ovelhas, a proteína e o RNAm para ALK-6 e BMPRII foram detectados tanto nas células da granulosa quanto nos oócitos de folículos pré-antrais (Wilson et al., 2001; Souza et al., 2002). De

modo similar, em cabras foi verificada a expressão do RNAm para estes dois receptores nos oócitos e nas células da granulosa de folículos antrais (Silva et al., 2004b), sugerindo, assim, um importante papel da BMP-15 na regulação da função destes dois tipos celulares durante o desenvolvimento folicular.

Durante sua ação biológica na célula, a BMP-15 se liga primariamente ao receptor ALK-6 e, em seguida, promove o recrutamento do receptor BMPR-II para o complexo pré-formado (Moore et al., 2003; Shimasaki et al., 2004). Este último receptor, por conseguinte, induz à fosforilação do ALK-6 já previamente ligado à proteína, determinando a fosforilação de moléculas de sinalização intracelular denominadas *Smads*. Essas moléculas, classificadas como *Smads* 1, 5 e 8, interagem com outra molécula (*Smad* 4), resultando na formação de um complexo sinalizador que é translocado para o núcleo a fim de regular a transcrição de genes-alvo e, deste modo, determinar a ação da proteína (Moore e Shimasaki, 2005; Fig. 3).

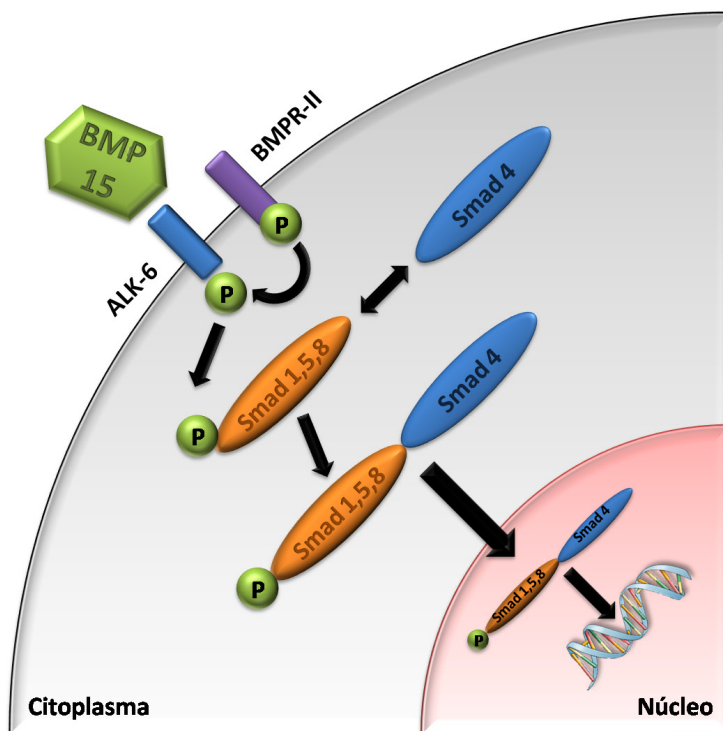


Figura 3. Via de sinalização da BMP-15. A BMP-15 se liga primariamente ao receptor ALK-6, ao qual apresenta maior afinidade, e em seguida recruta o receptor BMPR-II constitutivamente fosforilado. O BMPR-II, por sua vez, transfosforila o ALK-6 previamente ligado à BMP-15, induzindo a fosforilação das proteínas de sinalização intracelular, denominadas *Smads* 1, 5 e 8. Os *Smads* 1, 5 e 8 fosforilados interagem com o *Smad* 4 e o complexo formado é translocado para o núcleo, onde interage com fatores transcricionais e regula a expressão de genes-alvo, determinando a ação da proteína.

Além da via de sinalização celular mediada pelos *Smads*, evidências indicam que outras vias sinalizadoras também estão envolvidas na ação da BMP-15 e de outras BMPs (Von Bubnoff e Cho, 2001; Nohe et al., 2002). Nesse contexto, estudos têm demonstrado que proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) podem modular a transdução de sinais das BMPs por meio da atuação em pontos comuns com a via *Smad*. De fato, tem-se verificado que moléculas MAPK ativadas podem transduzir positivamente os sinais de proteínas BMPs (Su et al., 2002) ou atuar como inibidores da sinalização *Smad* (Von Bubnoff e Cho, 2001). Segundo Moore et al. (2003), os efeitos positivos da BMP-15 sobre a proliferação e diferenciação das células da granulosa são dependentes da atuação de moléculas específicas da família MAPK, o que reforça a existência de uma via alternativa para regulação da ação da BMP-15. Adicionalmente, verificou-se que a folistatina, importante proteína de ligação expressa nas células da granulosa, pode bloquear a bioatividade da BMP-15 (Otsuka et al., 2001a), consistindo em uma via complementar de regulação da proteína.

#### Papel da BMP-15 na foliculogênese e fertilidade

A BMP-15 tem sido considerada um importante regulador do desenvolvimento folicular e da ovulação em mamíferos (Galloway et al., 2000; Shimasaki et al., 2004; Juengel et al., 2004; McNatty et al., 2005a). Inicialmente, estudos realizados em roedores caracterizaram a BMP-15 como um potente estimulador da proliferação das células da granulosa, demonstrando intensa capacidade de aumentar a incorporação da timidina- $H^3$  e o número de células foliculares *in vitro* (Otsuka et al., 2000). Posteriormente, essa ação da BMP-15 foi

confirmada em estudos com células da granulosa de humanos (Di Pasquale et al., 2004) e ruminantes (McNatty et al., 2005b), nos quais também foi verificada sua intensa atividade mitótica nestas células. Além dessa característica, a BMP-15 pode estimular o desenvolvimento de folículos primordiais e primários em roedores (Otsuka et al., 2000; Fortune, 2003) e aumentar a expressão do KL nas células da granulosa de ratas (Otsuka e Shimasaki, 2002).

A proteína BMP-15 tem sido reconhecida ainda como um importante inibidor da expressão do receptor de FSH em células da granulosa, determinando o bloqueio da síntese de progesterona induzida pelo FSH e inibindo também a expressão de proteínas (StAR e P450scc) envolvidas na esteroidogênese e estimuladas por esta gonadotrofina (Otsuka et al., 2001b). Essa característica tem sido intrinsecamente relacionada à habilidade da BMP-15 em induzir à inibição do processo de luteinização precoce (Otsuka et al., 2001b; Shimasaki et al., 2004). Em ovelhas (Juengel et al., 2002a) e peixes (Clelland et al., 2006), observou-se que a BMP-15 apresenta um papel relevante no desenvolvimento folicular até o estágio ovulatório, sugerindo a efetiva participação desta proteína durante os estágios iniciais e finais da foliculogênese. De fato, estudos com imunização passiva contra a BMP-15 revelaram que ovelhas imunizadas apresentavam quantidade reduzida de folículos em estágios superiores ao primário e ainda baixa taxa de formação de antro e ovulação (Juengel et al., 2002a, b).

Ovelhas Inverdale e Hanna, por apresentarem mutações inativadoras da BMP-15 (FecX<sup>L</sup> e FecX<sup>H</sup>), constituem modelo interessante para a compreensão do papel desta proteína no controle da foliculogênese, bem como na determinação da fertilidade e da taxa de ovulação. Nestes animais, a mutação em homozigose causa infertilidade com bloqueio da foliculogênese no estágio de folículo primário e, quando em heterozigose, resulta em aumento significativo na taxa de ovulação (Galloway et al., 2000). Acredita-se que a ausência de bioatividade da BMP-15 nas ovelhas homozigotas comprometeria a proliferação das células da granulosa e o subsequente desenvolvimento folicular, culminando com o bloqueio no estágio de folículo primário. Contudo, nas ovelhas heterozigotas, as maiores taxas ovulatórias possivelmente seriam resultantes do aumento da sensibilidade ao FSH, já que a BMP-15 inibe a expressão de receptores para essa gonadotrofina (Otsuka et al., 2001b). O FSH, por sua vez, atuaria acelerando o desenvolvimento folicular e induzindo à ovulação precoce nos pequenos folículos em crescimento (Shimasaki et al., 2004).

A importante atuação da BMP-15 na fertilidade de ovelhas foi confirmada em estudos complementares nesta espécie, nos quais se observou que mutações adicionais no gene que codifica a proteína BMP-15 (FecX<sup>B</sup>, FecX<sup>G</sup> e FecX<sup>L</sup>) foram determinantes do mesmo fenótipo de ovelhas Inverdale e Hanna, resultando similarmente em alta taxa de ovulação nas ovelhas heterozigotas e infertilidade nas homozigotas (Hanrahan et al., 2004; McNatty et al., 2005c). Em humanos, uma mutação neste gene tem sido também verificada em mulheres com infertilidade ocasionada por falha ovariana hipergonadotrófica (Di Pasquale et al., 2004). De fato, a proteína recombinante com esta mutação não apresentou atividade biológica e ainda desenvolveu um papel antagonista à proteína BMP-15 sem mutação (Di Pasquale et al., 2004). Outros estudos em humanos têm identificado mutações no gene da BMP-15 associadas com falha ovariana prematura (Di Pasquale et al., 2006; Dixit et al., 2006) ou, mais precisamente, com insuficiência ovariana primária (Welt, 2008). No entanto, os mecanismos pelos quais tais mutações afetam a estrutura e a função da proteína permanecem ainda desconhecidos (McMahon et al., 2008).

Diferentemente de ovinos e humanos, o papel da BMP-15 na foliculogênese em camundongos tem se mostrado menos significativo. Nesta espécie, a deleção completa do segundo exon do gene codificador da BMP-15 resultou apenas em subfertilidade nos animais homozigotos, com ausência de alterações detectáveis nos heterozigotos (Yan et al., 2001). Uma avaliação histológica nos ovários dos camundongos homozigotos mostrou que a ausência de BMP-15 bioativa não comprometeu o desenvolvimento folicular normal, sendo a subfertilidade observada nestes indivíduos resultante de defeitos somente na ovulação e fertilização (Yan et al., 2001). Considerando a importante atuação da BMP-15 na foliculogênese e na fertilidade de humanos e ovinos (espécies monovulatórias), e os mínimos efeitos desta proteína em camundongos (espécie poliovulatória), tem-se sugerido a ocorrência de diferenças espécie-específicas relacionadas aos efeitos causados pelas mutações no gene da BMP-15 (Yan et al., 2001; Galloway et al., 2002). De fato, um estudo recente demonstrou que existem diferenças entre espécies mono e poliovulatórias e que estas podem ser atribuídas ao momento do processamento da pró-proteína BMP-15 em sua forma madura (ativa; Yoshino et al., 2006). Segundo tal estudo, em mamíferos monovulatórios, este processamento ocorre desde o início da foliculogênese, enquanto nas espécies poliovulatórias, ele é iniciado apenas no momento da ovulação.

Com o intuito de potencializar os efeitos individuais da BMP-15 e assim reforçar sua atuação sobre a foliculogênese, esta proteína tem sido frequentemente associada ao GDF-9 (McNatty et al., 2005a, b). Um efeito potencializado desses dois fatores de crescimento foi evidenciado em células da granulosa de ratas, nos quais a BMP-15 e o GDF9 (ambos de origem ovina), atuando isoladamente, foram incapazes de estimular a incorporação da timidina-H<sup>3</sup>, mas, quando associados, aumentaram de quatro a nove vezes a incorporação deste marcador. Aliada a isto, a combinação de BMP-15 e GDF-9 inibiu significativamente a produção de progesterona e estimulou a síntese de inibina- $\alpha$ , o que não foi observado quando ambos os fatores foram adicionados separadamente (McNatty et al., 2005a). De modo similar, efeitos cooperativos da BMP-15 e do GDF-9 também foram observados em alguns parâmetros relacionados às células da granulosa de bovinos e ovinos, incluindo a incorporação da timidina-H<sup>3</sup> e a inibição da síntese de progesterona (McNatty et al., 2005b).



Visto que a BMP-15 e o GDF-9 são secretados pelo oócito durante todo o crescimento folicular, evidências sugerem que estes dois fatores de crescimento interagem entre si, atuando nas células-alvo como um único complexo funcional (Juengel e McNatty, 2005).

A interação entre BMP-15 e GDF-9 foi adicionalmente relatada em estudos com cultivo de complexos *cumulus*-oócitos (COCs) bovinos, nos quais se observou que os COCs tratados com estes dois fatores de crescimento apresentaram aumento no potencial de desenvolvimento oocitário até o estágio de blastocisto (Hussein et al., 2006). Neste mesmo trabalho, também foi constatada uma redução na competência do desenvolvimento oocitário após a utilização de antagonistas da BMP-15 (folistatina) ou do GDF-9 (SB431542) durante o cultivo *in vitro*. Outros estudos com cultivo de COCs revelaram a importante atuação da BMP-15 sobre a expansão das células do *cumulus* em camundongos (Yoshino et al., 2006), bem como sobre a indução da glicólise e expressão gênica de enzimas glicolíticas nestas células (Sugiura et al., 2007). Esta última função foi atribuída à BMP-15 em associação com outro fator de crescimento secretado pelo oócito, denominado Fator de Crescimento Fibroblástico 8B (FGF8B). Considerando-se que os oócitos de mamíferos são deficientes na realização da via glicolítica e dependem de produtos da glicólise oriundos das células do *cumulus*, a BMP-15 e o FGF8B, por causarem efeitos positivos sobre o processo glicolítico, apresentam presumivelmente um papel relevante sobre o desenvolvimento do oócito *in vivo* (Sugiura et al., 2007; Li et al., 2008).

### Kit Ligand (KL)

#### *Características estruturais e sítios de expressão da proteína KL*

O KL, também conhecido como *Fator Stem Cell* (FSC), é um fator de crescimento pluripotente envolvido na diferenciação e no crescimento de algumas linhagens de células-tronco hematopoiéticas, neuroblastos, melanoblastos e células germinativas primordiais (Galli et al., 1994). A proteína KL, codificada pelo gene *Steel* (*Sl*), é expressa como uma molécula solúvel (KL-1) ou como uma molécula associada à membrana (KL-2), dependendo de como o RNAm é processado após a transcrição (Huang et al., 1992). Inicialmente, o KL-1 e o KL-2 encontram-se associados à membrana, apresentando em sua estrutura um domínio extracelular, um domínio transmembranário hidrofóbico e uma pequena cauda citoplasmática (Hutt et al., 2006b). Como mostrado na Fig. 4, o KL-1 é eficientemente clivado, liberando seu domínio extracelular como um produto solúvel devido à presença de um sítio de clivagem proteolítico em sua estrutura, codificado por um exon específico (exon 6). Já o KL-2 não apresenta este sítio de clivagem, em decorrência da ausência do exon 6, permanecendo estavelmente ancorado à membrana (Huang et al., 1992).

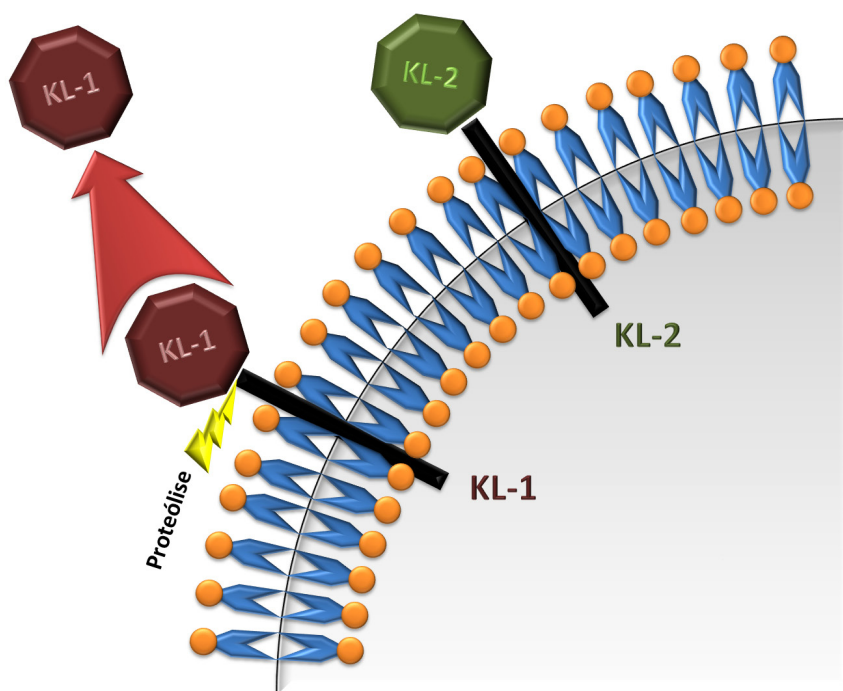


Figura 4. Estrutura das isoformas do KL. O KL-1 e o KL-2 encontram-se inicialmente ancorados à membrana, sendo dotados de um domínio extracelular, um domínio transmembranário hidrofóbico e uma pequena cauda citoplasmática. O KL-1, contudo, sofre proteólise devido à presença de um sítio de clivagem codificado pelo exon 6, resultando na liberação de seu domínio extracelular (forma solúvel). Já o KL-2 permanece estavelmente ancorado à membrana, em virtude da ausência do exon 6 e do sítio de clivagem proteolítica.

Sob condições fisiológicas, o KL se apresenta em sua forma monomérica (Hsu et al., 1997). No entanto, evidências sugerem que as atividades biológicas de ambas as isoformas do KL (KL-1 e KL-2) são dependentes da formação de homodímeros ligados não covalentemente (Arakawa et al., 1991; Hsu et al., 1997). Aliado a isto, tem-se hipotetizado que a dimerização regula a ativação do receptor e influencia a afinidade de ligação da proteína, refletindo em sua atividade (Zhang et al., 2000). A atividade biológica do KL tem sido relacionada ainda à presença de resíduos de aminoácidos em sua molécula (Langley et al., 1994; Matous et al., 1996), bem como à formação de sítios de glicosilação (Lu et al., 1992; Hutt et al., 2006b). Os aminoácidos, dentre outras funções, desempenham importante papel no transporte do KL para a superfície celular. De fato, Paulhe et al. (2004) verificaram que o transporte de KL para a membrana plasmática necessita de um resíduo de valina C-terminal localizado próximo aos domínios transmembrana e citoplasmático.

No ovário, a expressão do RNAm para o KL já foi mostrada nas células da granulosa de diversas espécies, incluindo humanos (Hoyer et al., 2005), roedores (Manova et al., 1993; Ismail et al., 1996), ovinos (Tisdall et al., 1997) e caprinos (Silva et al., 2006). Em camundongos (Manova et al., 1993) e ovelhas (Tisdall et al., 1997), a expressão do KL foi detectada nas células da granulosa em todos os estágios do desenvolvimento folicular. Similarmente, em ovários de fetos humanos, a presença dessa proteína foi identificada nas células da granulosa tanto de folículos pré-antrais quanto de folículos antrais iniciais (Hoyer et al., 2005). Já em caprinos, a proteína e o RNAm para o KL e para o seu receptor (c-kit) foram verificados em todas as categorias foliculares e ainda no corpo lúteo, na superfície do epitélio ovariano e no tecido medular do ovário (Silva et al., 2006), sugerindo um importante papel do KL sobre a foliculogênese e a atividade luteal, bem como sobre a regulação de outros processos locais. Adicionalmente, alguns estudos com folículos murinos detectaram a expressão do KL no oócito. No entanto, acredita-se que essa localização da proteína tenha resultado da endocitose mediada pelo c-kit, estavelmente expresso nessa estrutura (Kang et al., 2003; Hutt et al., 2006b).

#### *Receptores e vias de sinalização celular do KL*

O KL exerce seus efeitos biológicos por meio da ligação com um receptor tirosina-quinase, denominado c-kit. Durante o desenvolvimento ovariano pós-natal, o RNAm e a proteína do c-kit são encontrados nos oócitos em todos os estágios do desenvolvimento folicular, bem como em células intersticiais e tecaais de folículos antrais de roedores (Motro e Bernstein, 1993), ovinos (Clark et al., 1996) e caprinos (Silva et al., 2006). Além disso, o c-kit também tem sido identificado em células germinativas primordiais de roedores (Manova et al., 1990) e ovinos (Clark et al., 1996) durante a migração para a gônada e o processo de multiplicação por mitose (Hutt et al., 2006b).

Durante a ligação do KL ao seu receptor c-kit, diferentes padrões de sinalização podem ser ativados. Nesse contexto, diversos estudos têm contribuído para elucidar melhor o padrão de sinalização do sistema KL/c-kit via PI3K-AKT-FKHRL1 e PTEN (Fig. 5). A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é um padrão de sinalização fundamental para a regulação da proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo celular, além de ter um importante papel na regulação da ativação de folículos primordiais (Cantley, 2002; John et al., 2009). Em estudos realizados por Reddy et al. (2005) utilizando ovários de camundongas e ratas, observou-se que o padrão PI3K no oócito é regulado pelo KL oriundo das células da granulosa, sendo este padrão de grande importância para o desenvolvimento folicular inicial. Esses estudos sugerem que as ações do KL na transição de folículos primordiais para primários e no seu posterior desenvolvimento podem envolver a ativação da AKT e a inibição da atividade do FKHRL1 no oócito. De fato, a ativação da PI3K nos oócitos leva à fosforilação da AKT serina/treonina-quinase e do fator de transcrição FKHRL1 em oócitos de camundongas e ratas, resultando na ativação da AKT e na supressão do FKHRL1 (Reddy et al., 2005). A AKT é uma molécula sinalizadora conhecida por aumentar a proliferação e a sobrevivência celular, bem como a síntese de glicogênio e proteína (Blume-Jensen e Hunter, 2001). O FKHRL1 (Foxo3a), por sua vez, corresponde a um membro da subfamília FOXO de fatores de transcrição, a qual consiste do Foxo3a, Foxo1 (FKHR) e Foxo4 (AFX), todos efetores negativos do padrão PI3K/AKT/PTEN (Tran et al., 2003). Além disso, o FKHRL1, substrato da AKT, é um fator transcricional que leva à apoptose e à parada do ciclo celular. Portanto, tem sido sugerido que a AKT estimula o desenvolvimento do oócito, enquanto o FKHRL1 o inibe. Vale ressaltar que, além do FKHRL1 (Foxo 3a), o Foxo1 e o Foxo4 também podem ser fosforilados pela via PI3K, resultando na inibição da apoptose e na ativação do ciclo celular (Accili e Arden, 2004).

Recentemente, John et al. (2008) também demonstraram que o padrão PI3K-AKT, ativado pela interação KL/c-kit, tem um papel chave no início do crescimento do oócito e atua via FKHRL1. A ablação da fosfatase lipídica específica do oócito, PTEN (fosfatase e tensina homóloga com deleção no cromossomo 10), resultou na hiperativação da AKT, hiperfosforilação e exportação nuclear do FKHRL1, culminando na ativação global dos folículos primordiais e em falha ovariana prematura. Aliadas a isto, evidências genéticas de camundongos com ausência de PTEN (maior regulador negativo do padrão PI3K) nos oócitos mostraram que houve ativação de todo o reservatório de folículos primordiais no ovário (Castrillon et al., 2003), demonstrando o relevante papel do padrão de sinalização PI3K, estimulado pelo KL, sobre o desenvolvimento oocitário e folicular.



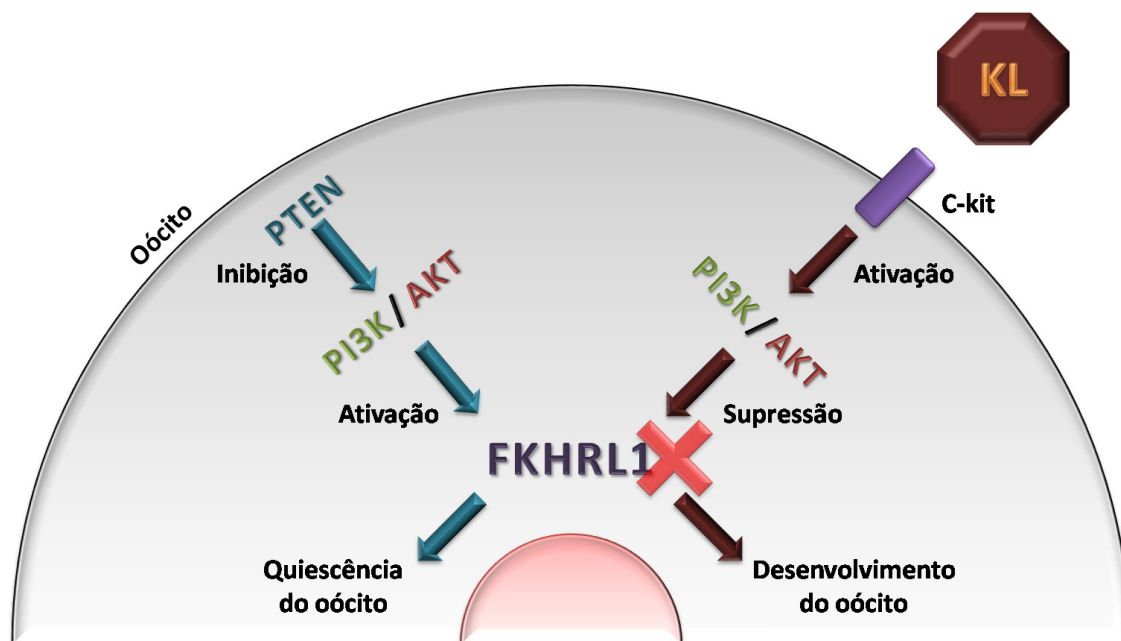


Figura 5. Via de sinalização do KL. A fosfatase lipídica específica do oócito (PTEN) atua como um regulador negativo do padrão PI3K/AKT, induzindo a ativação do fator de transcrição FKHRL1 e o consequente bloqueio do desenvolvimento oocitário (quiescência). A ativação do sistema KL/c-kit, por sua vez, ativa o padrão PI3K/AKT, ocasionando a supressão do FKHRL1 e resultando no estímulo ao desenvolvimento e crescimento do oócito.

#### *Interação KL/c-kit durante a oogênese e o desenvolvimento folicular*

O sistema KL/c-kit possui diversos papéis sobre a oogênese e a foliculogênese em espécies mamíferas (Thomas e Vanderhyden, 2006; Hutt et al., 2006b; Celestino et al., 2009). No que diz respeito à oogênese, vários estudos com embriões têm observado a participação da proteína KL e de seu receptor na migração de células germinativas primordiais (CGP) em direção à gônada ovariana primitiva (Matsui et al., 1990; Keshet et al., 1991; Molyneaux e Wylie, 2004). Evidências indicam que o KL, expresso em células somáticas ao longo da via migratória (Fleischman, 1993), interage com o receptor c-kit presente na superfície das CGP, direcionando a sua migração. Essa hipótese tem sido reforçada por estudos com embriões de camundongos, nos quais mutações nos genes do KL e do c-kit (*Steel* e *White spotting*) determinaram falhas ou alterações na migração das CGP até a gônada primitiva (McCoshen e McCallion, 1975; Buehr et al., 1993).

Trabalhos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram a participação do KL também na proliferação e sobrevivência de CGP (Dolci et al., 1991; Matsui et al., 1991; Sakata et al., 2003). Segundo Sakata et al. (2003), a atuação do KL sobre a sobrevivência deste tipo celular ocorre em virtude dos seus efeitos negativos sobre a apoptose mediada pelo ligante Fas. Estes pesquisadores mostraram que a ativação do receptor c-kit regula negativamente a apoptose nas CGP induzida pelo Fas e que a adição *in vitro* de KL exógeno suprime a expressão deste ligante (Sakata et al., 2003). Outro importante estudo também tem sugerido que o KL, em sinergismo com o Fator de Crescimento semelhante à Insulina I (IGF-I) e com o Fator Inibidor da Leucemia (LIF), promove a entrada das CGP na primeira divisão meiótica, o que possivelmente está associado ao efeito positivo do KL sobre a sobrevivência das células germinativas (Lyrakou et al., 2002). Adicionalmente, um papel antiapoptótico do sistema KL/c-kit tem sido observado em oogônias e oócitos derivados de gônadas fetais (Driancourt et al., 2000).

O KL, em associação ao seu receptor c-kit, tem sido considerado um dos reguladores-chave do crescimento folicular, atuando na ativação de folículos primordiais e no seu desenvolvimento além do estágio primário. Essa informação foi inicialmente demonstrada por Yoshida et al. (1997) em um experimento *in vivo* utilizando camundongas tratadas com anticorpo anti-c-kit (ACK-2). Nesse experimento, observou-se que o bloqueio da função do receptor afetou o recrutamento de folículos primordiais, e ainda o crescimento de folículos primários, a formação de antro e o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios. Posteriormente, Parrott e Skinner (1999) comprovaram a atuação do KL sobre o desenvolvimento de folículos primordiais por meio do cultivo *in vitro* de tecido ovariano de ratas. De modo similar ao experimento *in vivo*, os resultados desse estudo mostraram que a inclusão do anticorpo ACK-2 no meio de cultivo bloqueou o início do crescimento folicular, enquanto a adição de KL induziu a um aumento no percentual de folículos em desenvolvimento. Mais recentemente, estudos *in vitro* também observaram os efeitos do KL sobre a ativação folicular em outras

espécies, como humanos (Carlsson et al., 2006) e caprinos (Celestino et al., 2010). Nesta última espécie, além da ativação, a adição de KL (50 ng/mL) *in vitro* também promoveu a manutenção da sobrevivência folicular. Embora este conjunto de achados demonstre a atuação do KL na ativação de folículos primordiais, tem-se verificado que outros fatores de crescimento estão envolvidos juntamente com o KL na potencialização deste processo, destacando-se o FGFb e o Fator de Crescimento Queratinócito (KGF). Estudos têm demonstrado que o FGFb e o KGF agem nas células da granulosa estimulando a expressão de KL, o qual, por sua vez, passa a atuar sinergicamente com estes dois fatores na ativação folicular (Nilsson e Skinner, 2004; Kezele et al., 2005). Além destes, outros fatores de crescimento também parecem estar implicados no processo de ativação, incluindo as Proteínas Morfogenéticas Ósseas 4 e 7 (BMP-4 e BMP-7) e o LIF (Nilsson et al., 2002; Nilsson e Skinner, 2003; Lee et al., 2004).

O sistema KL/c-kit também tem sido implicado na indução do crescimento oocitário durante os estágios iniciais da foliculogênese. Packer et al. (1994), utilizando ovários de camundongas com 8 dias de idade, verificaram que o tratamento *in vitro* de folículos com KL aumentou significativamente a taxa de crescimento dos oócitos. Contrariamente, Cecconi e Colonna (1996) não observaram efeitos deste fator sobre oócitos de camundongas de 12 dias de idade, sugerindo que o KL pode ter variações em sua função de acordo com as fases de desenvolvimento oocitário. Mais recentemente, Hutt et al. (2006a) identificaram a atuação estimulatória do KL sobre o crescimento de oócitos de camundongas recém-nascidas e de coelhas jovens, demonstrando nesse estudo que este fator pode agir diferentemente entre espécies. Nas camundongas, o aumento no diâmetro oocitário induzido pelo KL foi significativo apenas em folículos primordiais e primários iniciais. Nas coelhas, contudo, o KL exógeno induziu ao crescimento dos oócitos em fases mais avançadas do desenvolvimento folicular, atuando tanto em folículos iniciais (primordiais e primários) quanto em folículos primários em crescimento.

Mudanças na concentração das isoformas do KL têm resultado em efeitos distintos sobre o desenvolvimento oocitário. Um estudo inicial realizado por Thomas et al. (2005) revelou que, em complexos células da granulosa-oócito (CGO) cultivados em baixas concentrações de FSH, a proporção KL-1/KL-2 é reduzida em decorrência da elevação na concentração de RNAm para KL-2. Este padrão de expressão resultou em aumento do diâmetro dos oócitos, sugerindo que o correto equilíbrio entre estas duas isoformas é necessário para o adequado desenvolvimento oocitário *in vitro* e que o KL-2 seria presumivelmente a principal isoforma envolvida no crescimento dos oócitos. Essa hipótese foi posteriormente confirmada em outro estudo desta mesma equipe, no qual se verificou que o aumento no diâmetro oocitário ocorreu somente quando oócitos foram cultivados em meio contendo KL-2 e que a inibição da expressão desta isoforma induziu prejuízo ao crescimento dos oócitos (Thomas et al., 2008). Além de tais resultados, este estudo também demonstrou uma atuação do KL-2 sobre a sobrevivência oocitária *in vitro*, corroborando com demais trabalhos nos quais o KL influenciou positivamente a sobrevivência de oócitos (Jin et al., 2005) e de outros tipos celulares (Caceres-Cortes et al., 1994; Carson et al., 1994; Packer et al., 1995).

O KL tem sido associado ainda a uma série de eventos foliculares, incluindo proliferação das células da granulosa, regulação da esteroidogênese e recrutamento de células da teca. Reynaud et al. (2000) mostraram que, em folículos pré-antrais de camundongas, o KL na concentração de 50 ng/mL aumentou significativamente a multiplicação das células da granulosa. Aliado a isto, estes autores também constataram que a adição de um inibidor do c-kit (SC1494) durante o cultivo *in vitro* reduziu a atividade da enzima aromatase nas células da granulosa, evidenciando a participação do sistema KL/c-kit sobre a esteroidogênese ovariana. Estudos adicionais com a proteína KL também constataram os seus efeitos positivos sobre o recrutamento de células da teca em folículos pré-antrais de roedores e bovinos (Parrott e Skinner, 1997, 2000; Huang et al., 2001). Nesta última espécie, verificou-se que o KL promove a formação de células da teca ao redor de pequenos folículos pré-antrais (Parrott e Skinner, 2000) e ainda estimula a sua proliferação, bem como a síntese local de esteroides local (Parrott e Skinner, 1997, 2000). Uma vez que a camada da teca é formada, inicia-se a produção de KGF e de testosterona pelas células tecais, os quais influenciam a função e o crescimento das células da granulosa e a própria expressão do KL (Parrott e Skinner, 1998; Joyce et al., 1999).

Estudos realizados em roedores têm constatado um papel adicional do KL sobre a inibição da maturação meiótica de oócitos. Ismail et al. (1996) mostraram que oócitos cultivados por 24 horas na presença de concentrações de KL variando de 50 a 500 ng/mL apresentaram um bloqueio transitório na retomada do processo meiótico. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que a inativação do receptor c-kit em oócitos de ratas com interrupção da meiose aumentou a habilidade destes oócitos em reiniciar tal processo (Ismail et al., 1997). Deste modo, sugeriu-se que oócitos completamente desenvolvidos, já próximos à maturação, inibem a expressão do KL nas células do *cumulus*, bloqueando os consequentes efeitos deste fator sobre a interrupção da meiose (Joyce et al., 1999, 2000). Mais recentemente, Ye et al. (2009) demonstraram, após cultivo *in vitro*, que o KL atua diretamente em oócitos de folículos pré-ovulatórios, promovendo a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Com base nessas informações, pode-se inferir que a interação entre o KL e o seu receptor c-kit exerce importante papel sobre o controle da maturação nuclear do oócito (Driancourt et al., 2000; Hutt et al., 2006b).

### Papel diferencial da isoforma KL-2

Estudos de expressão gênica têm mostrado que a concentração de RNAm para KL-1 e KL-2 varia entre tecidos (Huang et al., 1992), entre ovários de camundongas de diferentes idades (Manova et al., 1993) e entre populações de células da granulosa (Ismail et al., 1997), indicando possíveis diferenças nos papéis biológicos destas duas isoformas. O KL-2, estavelmente ancorado à membrana, tem sido considerado a isoforma mais potente do KL em virtude de sua capacidade de induzir ativação mais persistente (por um tempo mais prolongado) do receptor c-kit (Kurosawa et al., 1996). De fato, estudos *in vivo* constataram que a sobrevivência de células germinativas primordiais é suportada pelo KL-2, enquanto a forma solúvel (KL-1) apresenta apenas efeito limitado sobre a sobrevivência desse tipo celular (Dolci et al., 1991). Além disso, observou-se que o KL-1 requer também a participação da forma associada à membrana para regular a proliferação dessas células (Kawase et al., 2004).

Mutações no gene *Steel* evidenciaram ainda o papel potencial do KL-2 sobre a fertilidade de camundongos, mostrando que indivíduos que sintetizavam somente KL-1 eram estéreis, devido a uma deficiência no desenvolvimento das células germinativas, enquanto aqueles que produziam exclusivamente KL-2 apresentavam-se férteis (Flanagan et al., 1991; Tajima et al., 1998). Além deste papel, o KL-2 também tem sido implicado no estímulo ao crescimento de oócitos e na manutenção da sobrevivência oocitária *in vitro*. Segundo Thomas et al. (2008), o efeito positivo do KL-2 sobre o crescimento dos oócitos é resultante do aumento na expressão do receptor c-kit induzido por esta isoforma, o que, ao contrário, não ocorre na presença de KL-1 exógeno. O KL-1, apesar de previamente associado ao aumento no crescimento oocitário (Packer et al., 1994), resultou apenas em crescimento limitado dos oócitos *in vitro*. Esses achados evidenciam, portanto, que a forma do KL associada à membrana apresenta de fato uma atividade mais potente e com resultados mais significativos em relação à forma solúvel da proteína.

### Interações entre BMP-15 e KL

Embora a BMP-15 e o KL apresentem papéis distintos e específicos durante o desenvolvimento folicular, importantes interações entre estes dois fatores de crescimento já foram descritas na literatura (Otsuka e Shimasaki, 2002; Thomas et al., 2005). A primeira evidência concreta da interação entre BMP-15 e KL e dos efeitos deste fenômeno sobre a foliculogênese foi obtida a partir de um estudo utilizando cocultivo de oócitos e células da granulosa de ratas. Nesse estudo, observou-se que a BMP-15 estimula a expressão de KL nas células da granulosa, enquanto o KL inibe a expressão de BMP-15 nos oócitos, determinando a existência de um sistema de *feedback* negativo entre estes dois fatores de crescimento (Fig. 6). Além disso, observou-se que as atividades mitóticas tanto da BMP-15 quanto do KL são dependentes deste sistema de comunicação entre oócito e células da granulosa (Otsuka e Shimasaki, 2002).

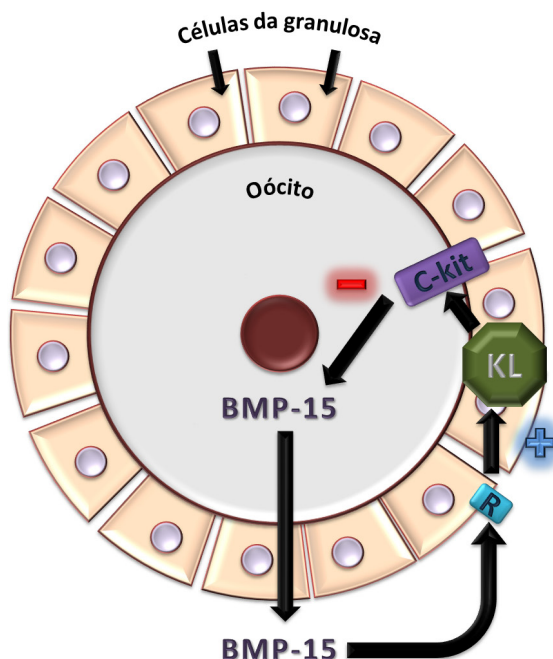


Figura 6. Interação entre BMP-15 e KL. A BMP-15 atua em seu receptor (R) presente nas células da granulosa, estimulando a expressão de KL. O KL, por sua vez, age no c-kit expresso no oócito suprimindo a expressão da BMP-15. Esta interação mostra a existência de um sistema de *feedback* negativo entre as células da granulosa e o oócito.

Outros trabalhos mostraram que oócitos com crescimento incompleto, isolados de ovários de camundongas jovens, aumentaram a expressão do KL quando cocultivados com células da granulosa, sugerindo que o estímulo à expressão do KL tenha sido resultante da produção de BMP-15 pelos oócitos (Packer et al., 1994; Joyce et al., 1999). Mais recentemente, Thomas et al. (2005) verificaram que a BMP-15 aumentou a expressão de ambas as isoformas do KL durante o cultivo *in vitro* de oócitos e células da granulosa, o que forneceu importantes evidências sobre a relação molecular entre BMP-15 e KL.

### Considerações finais

Várias evidências indicam que as interações entre o oócito e as células da granulosa são críticas para assegurar a perfeita coordenação do desenvolvimento oocitário e folicular. Nesse contexto, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de se estabelecer sistemas *in vitro* e *in vivo* que revelem características e funções de diferentes proteínas, incluindo a BMP-15 e o KL, diretamente envolvidas na comunicação entre oócitos e células da granulosa. Estas duas proteínas, abordadas na presente revisão, possuem papel crucial sobre a foliculogênese e fertilidade em mamíferos, apresentando ações regulatórias sobre o oócito e as células somáticas foliculares, fundamentais para garantir a maturação oocitária e subsequente ovulação. No entanto, embora haja um grande número de pesquisas envolvendo estes dois fatores de crescimento, os conhecimentos sobre seus papéis específicos na reprodução da fêmea mamífera são ainda limitados. Desta forma, torna-se essencial a elucidação dos complexos mecanismos de atuação da BMP-15 e do KL, bem como de suas interações, sobre a função ovariana a fim de, futuramente, estabelecer novas metodologias e técnicas *in vitro* para otimizar a fertilidade de animais domésticos e de humanos.

### Referências bibliográficas

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, p.2744-2750, 1999.
- Abir R, Nitke S, Ben-Haroush A, Fisch B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol Histopathol*, v.21, p.887-898, 2006.
- Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, v.117, p.421-426, 2004.
- Amorim CA, Rodrigues APR, Lucci CM, Figueiredo JR, Gonçalves PBD. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *Small Rumin Res*, v.37, p.269-277, 2000.
- Arakawa T, Yphantis DA, Lary JW, Narhi LO, Lu HS, Prestrelski SJ, Clogston CL, Zsebo KM, Mendiaz EA, Wypych J. Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure. *J Biol Chem*, v.266, p.18942-18948, 1991.
- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v.38, p.87-98, 1989.
- Bhatia M. Apoptosis versus necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, v.284, p.608-627, 2004.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, v.411, p.355-365, 2001.
- Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v.70, p.231-239, 2005.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.5-13, 2006.
- Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S. Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos *Dev Dyn*, v.198, p.182-189, 1993.
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, v.4, p.2-20, 2004.
- Caceres-Cortes J, Rajotte D, Dumouchel J, Haddad P, Hoang T. Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. *J Biol Chem*, v.269, p.12084-12091, 1994.
- Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*, v.296, p.1655, 2002.
- Carlsson IB, Laitinen MPE, Scott JE, Louhio H, Velentzis L, Tuuri T, Aaltonen J, Ritvos O, Winston RML, Hovatta O. Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction*, v.131, p.641-649, 2006.
- Carson WE, Haldar S, Baiocchi RA, Croce CM, Caligiuri MA. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc Nat Acad Sci USA*, v.91, p.7553-7557, 1994.
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, v.301, p.215-218, 2003.
- Cecconi S, Colonna R. Influence of granulosa cells and of different somatic cell types on mammalian oocyte

development *in vitro*. *Zygote*, v.4, p.305-307, 1996.

**Celestino JJH, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos MHT, Saraiva MVA, Chaves RN, Martins FS, Almeida AP, Cunha RMS, Lima LF, Name KO, Campello CC, Silva JRV, Bão SN, Figueiredo JR.** Steady-State Level of Kit Ligand mRNA in goat ovaries and the role of Kit ligand in preantral follicle survival and growth *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v.77, p.231-240, 2010.

**Celestino JJH, Matos MHT, Saraiva MVA, Figueiredo JR.** Regulation of ovarian folliculogenesis by Kit Ligand and the c-Kit system in mammals. *Anim Reprod*, v.6, p.431-439, 2009.

**Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *Endocr Rev*, v.23, p.787-823, 2002.

**Clark DE, Tisdall DJ, Fidler AE, McNatty KP.** Localization of mRNA encoding c-kit during the initiation of folliculogenesis in ovine fetal ovaries. *J Reprod Fertil*, v.106, p.329-335, 1996.

**Clelland E, Kohli G, Campbell RK, Sharma S, Shimazaki S, Peng C.** Bone morphogenetic protein-15 in the zebrafish ovary: complementary deoxyribonucleic acid cloning, genomic organization, tissue distribution, and role in oocyte maturation. *Endocrinology*, v.147, p.201-209, 2006.

**Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L.** Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet*, v.75, p.106-111, 2004.

**Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M, Wasniewska M, Cole T, Beck-Peccoz P, Nelson LM, Persani L.** Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*, v.91, p.1976-1979, 2006.

**Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L.** Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet*, v.119, p.408-415, 2006.

**Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, Lyman SD, Boswell HS, Donovan PJ.** Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*, v.352, p.809-811, 1991.

**Driancourt M, Reynaud K, Cortvrindt R, Smits J.** Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod*, v.5, p.143-152, 2000.

**Drummond AE.** The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, v.4, p.1-11, 2006.

**Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM.** The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol*, v.12, p.1809-1817, 1998.

**Eckery DC, Whale LJ, Lawrence SB, Wylde KA, McNatty KP, Juengel JL.** Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Mol Cell Endocrinol*, v.92, p.115-126, 2002.

**Elmore S.** Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, v.35, p.495-516, 2007.

**Eppig JJ.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v.122, p.829-838, 2001.

**Eppig JJ, Viveiros MM, Bivens CM, De La Fuente R.** Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung PC, Adashi EY. (Ed.). *The Ovary*. San Diego: Elsevier, 2004. p.113-129.

**Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL.** The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.2890-2894, 2002.

**Erickson GF.** An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin Reprod Endocrinol*, v.4, p.233-254, 1986.

**Flanagan JG, Chan DC, Leder P.** Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell*, v.64, p.1025-1035, 1991.

**Fleischman RA.** From white spots to stem cells: the role of the kit receptor in mammalian development. *Trends Genet*, v.9, p.285-290, 1993.

**Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.

**Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN.** The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol*, v.55, p.1-96, 1994.

**Galloway SM, Gregan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH.** Bmp15 mutations and ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*, v.191, p.15-18, 2002.

**Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Ritvos O.** Mutations in an oocyte derived growth factor gene (BMP-15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Gen*, v.25, p.279-283, 2000.

**Greenfield CR, Pepling ME, Babus JK, Furth PA, Flaws JA.** BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction*, v.133, p.865-876, 2007.

**Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM.** Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*, v.70, p.900-909, 2004.

**Hoyer PE, Byskov AG, Mollgard K.** Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol*, v.234, p.1-10, 2005.



- Hsu YR, Wu GM, Mendiaz EA, Syed R, Wypych J, Toso R, Mann MB, Boone TC, Narhi LO, Lu HS, Langley KE. The majority of stem cell factor exists as monomer under physiological conditions. Implications for dimerization mediating biological activity. *J Biol Chem*, v.272, p.6406–6415, 1997.
- Huang CT, Weitsman SR, Dykes BN, Magoffin DA. Stem cell factor and insulin-like growth factor-I stimulate luteinizing hormone-independent differentiation of rat ovarian theca cells. *Biol Reprod*, v.64, p.451–6, 2001.
- Huang EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the Kit-Ligand: KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell*, v.3, p.349-362, 1992.
- Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*, v.11, p.162-178, 2005.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci*, v.118, p.5257-5268, 2005.
- Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol*, v.296, p.514-521, 2006.
- Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. KIT/KIT Ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod*, v.75, p.421-433, 2006a.
- Hutt K, McLaughlin EA, Holland MK. KL and KIT have diverse roles during mammalian oogenesis. *Mol Hum Reprod*, v.12, p.61-69, 2006b.
- Ismail RS, Dube M, Vanderhyden BC. Hormonally regulated expression and alternative splicing of kit ligand may regulate kit-induced inhibition of meiosis in rat oocytes. *Dev Biol*, v.184, p.333-342, 1997.
- Ismail RS, Okawara Y, Fryer JN, Vanderhyden BC. Hormonal regulation of the ligand for c-kit in the rat ovary and its effects on spontaneous oocyte meiotic maturation *Mol Reprod Dev*, v.43, p.458-469, 1996.
- Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol*, v.156, p.189-193, 1999.
- Jin X, Han CS, Yu FQ, Wei P, Hu ZY, Liu YX. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.82-90, 2005.
- John GB, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol*, v.321, p.197-204, 2008.
- John GB, Shidler MJ, Besmer P, Castrillon DH. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Dev Biol*, v.331, 292-299, 2009.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v.122, p.303-315, 2004.
- Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod*, v.63, p.1669-1675, 2000.
- Joyce IM, Pendola FL, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev Biol*, v.214, p.342-353, 1999.
- Joza N, Kroemer G, Penninger JM. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genetic*, v.18, p.142-149, 2002.
- Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR, McNatty KP. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.447-460, 2004.
- Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod*, v.67, p.1777-1789, 2002a.
- Juengel JL, Hudson NL, Smith P, Reader KL, McNatty KP. Bone morphogenetic protein 15 is essential for both the early and late stages of follicle development in sheep. *Biol Reprod*, v.66, suppl. 1, p.110, 2002b. Abstract, 31.
- 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.
- Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield SJ, McNatty KP. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol*, v.191, p.1-10, 2002c.
- Kang JS, Lee CJ, Lee JM, Rha JY, Song KW, Park MH. Follicular expression of c-Kit/SCF and inhibin- $\alpha$  in mouse ovary during development. *J Histochem Cytochem*, v.51, p.1447-1458, 2003.
- Katska-Ksiazkiewicz L. Recent achievements *in vitro* culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reprod Biol*, v.6, p.3-16, 2006.
- Kawase E, Hashimoto K, Pedersen RA. Autocrine and paracrine mechanisms regulating primordial germ cell proliferation. *Mol Reprod Dev*, v.68, p.5-16, 2004.





- Keshet E, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF.** Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *Embo J*, v.10, p.2425–2435, 1991.
- Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK.** Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod*, v.73, p.967-973, 2005.
- Klinger FG, De Felici M.** *In vitro* development of growing oocytes from fetal mouse oocytes: stage-specific regulation by stem cell factor and granulosa cells. *Dev Biol*, v.244, p.85-95, 2002.
- Knight PG, Glister C.** TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, v.132, p.191-206, 2006.
- Kurosawa K, Miyazawa K, Gotoh A, Katagiri T, Nishimaki J, Ashman LK, Toyama K.** Immobilized anti-Kit monoclonal antibody induces ligand independent dimerization and activation of steel factor receptor: biologic similarity with membrane-bound form of steel factor rather than its soluble form. *Blood*, v.87, p.2235-2243, 1996.
- Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O.** A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev*, v.78, p.135-140, 1998.
- Langley KE, Mendiaz EA, Liu N, Narhi LO, Zeni L, Parseghian CM, Clogston CL, Leslie I, Pope JA, Lu HS.** Properties of variant forms of human stem cell factor recombinantly expressed in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, v.311, p.55-61, 1994.
- 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 Q, McKenzie LJ, Matzuk MM.** Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Mol Hum Reprod*, v.14, p.673-678, 2008.
- Liao WX, Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S.** Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9: implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J Biol Chem*, v.278, p.3713-3719, 2003.
- Lu HS, Clogston CL, Wypych J, Parker VP, Lee TD, Swiderek K, Baltera RF, Patel AC, Chang DC, Brankow DW.** Post-translational processing of membrane-associated recombinant human stem cell factor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys*, v.298, p.150-158, 1992.
- Lucci CM, Amorim CA, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JR, Gonçalves PBD.** Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.39-49, 1999.
- Lyrakou S, Hulten MA, Hartshorne GM.** Growth factors promote meiosis in mouse fetal ovaries *in vitro*. *Mol Hum Reprod*, v.8, p.906-911, 2002.
- Manova K, Huang EJ, Angeles M, De Leon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer P, Bachvarova RF.** The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol*, v.157, p.85-99, 1993.
- Manova K, Nocka K, Besmer P, Bachvarova RF.** Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development*, v.110, p.1057-1069, 1990.
- 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.
- Matous JV, Langley K, Kaushansky K.** Structure-function relationships of stem cell factor: an analysis based on a series of human-murine stem cell factor chimera and the mapping of a neutralizing monoclonal antibody. *Blood*, v. 88, p.437-444, 1996.
- Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL.** Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, v.353, p.750-752, 1991.
- Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL.** Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature*, v.347, p.667-669, 1990.
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ.** Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, v.296, p.2178-2180, 2002.
- McCoshen JA, McCallion DJ.** A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice. *Experientia*, v.31, p.589-590, 1975.
- McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S.** Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.286, p.1923-1935, 2004.
- McLaughlin EA, McIver SC.** Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*, v.137, p.1-11, 2009.
- McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S.** Phosphorylation of bone morphogenetic Protein-15 and growth and differentiation factor-9 plays a critical role in determining agonistic or antagonistic functions. *Endocrinology*, v.149, p.812-817, 2008.
- McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O'Connell A, Tisdall DJ.**



- Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.11-20, 2000.
- McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome N.** Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction*, v.129, p.473-480, 2005a.
- McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MPE.** Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*, v.129, p.481-487, 2005b.
- McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL.** Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol*, v.234, p.57-66, 2005c.
- Molyneaux K, Wylie C.** Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol*, v.48, p.537-544, 2004.
- Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S.** Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem*, v.278, p.304-310, 2003.
- Moore RK, Shimasaki S.** Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol Cell Endocrinol*, v.234, p.67-73, 2005.
- Motro B, Bernstein A.** Dynamic changes in ovarian c-kit and syeel expression during the estrous reproductive cycle. *Dev Dyn*, v.197, p.69-79, 1993.
- Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK.** Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol*, v.188, p.65-73, 2002.
- 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.** Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*, v.214, p.19-25, 2004.
- Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P.** The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*, v.277, p.5330-5338, 2002.
- Ojeda SR, Romero C, Tapia V, Dissen GA.** Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.67-71, 2000.
- Otsuka F, Moore RK, Iemura S-I, 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, Shimasaki S.** A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosecell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.8060-8065, 2002.
- Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S.** Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem*, v.276, p.11387-11392, 2001b.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T-H, 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.
- Packer AI, Besmer P and Bachvarova RF.** Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. *Mol Reprod Dev*, v.42, p.303-310, 1995.
- Packer AI, Hsu YC, Besmer P, Bachvarova RF.** The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev Biol*, v.161, p.194-205, 1994.
- Padanilam BJ.** Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, v.284, p.F608-F627, 2003.
- Parrott JA, Skinner MK.** Direct actions of kit-ligand on theca cell growth and differentiation during follicle development. *Endocrinology*, v.138, p.3819-3827, 1997.
- Parrott JA, Skinner MK.** Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.55-64, 2000.
- Parrott JA, Skinner MK.** Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, v.140, p.262-271, 1999.
- Parrott JA, Skinner MK.** Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology*, v.139, p.2240-2245, 1998.
- Paulhe F, Imhof BA, Wehrle-Haller B.** A specific endoplasmic reticulum export signal drives transport of stem cell factor (Kitl) to the cell surface. *J Biol Chem*, v.279, p.55545-55555, 2004.
- Picton H, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v.145, p.27-37, 1998.
- Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, Lindgren P, Liu Y-x, Sun Q-y, Liu K.** Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol*, v.281, p.160-170, 2005.

- Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J, Driancourt MA.** Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev*, v.56, p.483-494, 2000.
- Sakata S, Sakamaki K, Watanabe K, Nakamura N, Toyokuni S, Nishimune Y, Mori C, Yonehara S.** Involvement of death receptor Fas in germ cell degeneration in gonads of Kit-deficient Wv/Wv mutant mice. *Cell Death Differ*, v.10, p.676-686, 2003.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF.** The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, v.25, p.72-101, 2004.
- 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.
- Silva JRV, van den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** The Kit ligand/c-Kit receptor system in goat ovaries: gene expression and protein localization. *Zygote*, v.14, p.317-328, 2006.
- Skinner MK.** Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v.11, p.461-471, 2005.
- 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.
- Su Y-Q, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ.** Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*, v.143, p.2221-2232, 2002.
- Sugiura K, Su Y-Q, Diaz FJ, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Matzuk MM, Shimasaki S, Eppig JJ.** Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, v.134, p.2593-2603, 2007.
- Suh CS, Sonntag B, Erickson GF.** The ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev Endocr Metab Disord*, v.3, p.5-12, 2002.
- Tajima Y, Moore MA, Soares V, Ono M, Kissel H, Besmer P.** Consequences of exclusive expression *in vivo* of kit ligand lacking the major proteolytic cleavage site. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.95, p.11903-11908, 1998.
- 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.
- Thomas FH, Ismail RS, Jiang J, Vanderhyden BC.** Kit ligand 2 promotes murine oocyte growth *in vitro*. *Biol Reprod*, v.78, p.167-175, 2008.
- Thomas FH, Vanderhyden BC.** Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol*, v.4, p.1-8, 2006.
- Tisdall DJ, Quirke LD, Smith P and McNatty KP.** Expression of the ovine stem cell factor gene during folliculogenesis in late fetal and adult ovaries. *J Mol Endocrinol*, v.18, p.127-135, 1997.
- Tran H, Brunet A, Griffith EC, Greenberg ME.** The many forks in FOXO's road. *Sci STKE*, n.172, re5, 2003.
- Van Cruchten S, Van den Broeck W.** Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*, v.31, p.214-223, 2002.
- Van den Hurk R, Bevers MM, Becker JF.** *Et al* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v.47, p.73-82, 1997.
- Van den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.
- Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJW.** Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol*, v.15, p.681-694, 2001.
- Von Bubnoff A, Cho KWW.** Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*, v.239, p.1-14, 2001.
- Welt CK.** Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v.68, p.499-509, 2008.
- Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, McEwan JC, O'Connell AR, McNatty KP, Montgomery GW.** Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod*, v.64, p.1225-1235, 2001.
- 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.



**Ye Y, Kawamura K, Sasaki M, Kawamura N, Groenen P, Gelpke MDS, Rauch R, Hsueh AJW, Tanaka T.** Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, v.7, p.26, 2009.

**Yoshida H, Takakura N, Nataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI.** Stepwise requirement of c-Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol*, v.184, p.122-137, 1997.

**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. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.103, p.10678-10683, 2006.

**Zama AM, Hudson FP, Bedell MA.** Analysis of Hypomorphic Kitlsl mutants suggests different requirements for kitl in proliferation and migration of mouse primordial germ cells. *Biol Reprod*, v.73, p.639-47, 2005.

**Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP.** Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.97, p.7732-7737, 2000.

---