



Papel das Proteínas Morfogenéticas Ósseas-6 e -7 (BMP-6 e -7) na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos

Role of Bone Morphogenetic Proteins-6 and -7 (BMP-6 and -7) in the regulation of early folliculogenesis in mammals

V.R. Araújo¹, A.P. Almeida, D.M. Magalhães, M.H.T. Matos, L.M.T. Tavares, 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

¹Correspondência: val_exclusiva@yahoo.com.br

Resumo

Estudos envolvendo a relação entre o oócito e as células que o circundam são muito importantes na compreensão dos fatores que regulam o complexo processo de foliculogênese. Dentre estes fatores, destacam-se as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que agem de maneira autócrina e/ou parácrina modulando a função ovariana. Tais proteínas constituem um dos maiores subgrupos de ligantes da superfamília TGF- β e mostram-se envolvidas durante o desenvolvimento folicular mamífero. Esta revisão aborda a influência das BMPs, mais especificamente as BMP-6 e -7, na foliculogênese inicial em mamíferos.

Palavras-chave: células da granulosa, foliculos, oócito, proteínas morfogenéticas ósseas.

Abstract

Studies concerning the relationship between the oocyte and its surrounding somatic cells is very important for the understanding of factors regulating the complex process of folliculogenesis. Among these factors it is important to mention the bone morphogenetic proteins (BMPs), which act in autocrine and/or paracrine manner modulating the ovarian functions. Such proteins represent one of the biggest subgroup of TGF- β superfamily and play an important role during follicular development in mammals. This review focus on the influence of BMPs, more specifically, the BMP-6 and -7, on the early folliculogenesis in mammals.

Keywords: bone morphogenetic proteins, follicles, granulosa cell, oocyte.

Introdução

A elucidação da função das diversas substâncias envolvidas no desenvolvimento folicular e atresia é importante para auxiliar na elaboração de um sistema de cultivo eficiente que permita a ativação folicular *in vitro*, assegurando o crescimento de um grande número de foliculos pré-antrais (Demeestere et al., 2005). A regulação do processo de foliculogênese é conduzida não apenas por hormônios endócrinos, mas também por fatores de crescimento produzidos localmente no ovário (Ruutiainen e Adashi, 1993).

Dentre as substâncias produzidas no ovário, destacam-se as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), membros de grande importância da superfamília dos fatores de crescimento transformantes- β (TGF- β). Nessa superfamília, as BMPs compreendem o maior subgrupo de ligantes, sendo descritas cerca de 20 BMPs (Massague e Wotton, 2000). Estas substâncias provavelmente exercem um efeito autócrino e/ou parácrino (Dooley et al., 2000), pois muitas destas moléculas são sintetizadas e secretadas pelo oócito (Eppig et al., 1997), possuindo efeitos positivos no que diz respeito à ativação folicular *in vivo* (Lee et al., 2001) e *in vitro* (Nilsson e Skinner, 2003; Lee et al., 2004).

Segundo Eppig (2001), os oócitos no interior dos foliculos antrais continuam influenciando o comportamento das células da granulosa via fatores específicos por eles secretados, regulando, portanto, o seu próprio microambiente. A BMP-15 e o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) exclusivamente produzidos pelo oócito, juntamente com a BMP-6, são os principais candidatos para esta função.

A expressão de receptores de BMPs nos oócitos de ovinos (Souza et al., 2002), camundongos (Erickson e Shimasaki 2003) e bovinos (Glister et al., 2004) sugere o envolvimento dessas proteínas na modulação do desenvolvimento, bem como na maturação oocitária. Em suínos, Zhu et al. (2008) verificaram diferentes padrões de expressão de BMPs, sugerindo também que uma complexa rede destes fatores pode realmente estar envolvida nos eventos fundamentais da maturação de oócitos. Tendo em vista os fortes indícios da atuação das BMPs na função reprodutiva de mamíferos, a presente revisão tem como objetivo abordar o papel intraovariano, especificamente das BMP-6 e -7, na foliculogênese inicial ou pré-antral.



Bases gerais da oogênese e da foliculogênese

Em mamíferos, os estádios iniciais do desenvolvimento ovariano, ainda no período pré-natal, são desencadeados pela migração das células germinativas primordiais do saco vitelino embrionário para a gônada primitiva e sua posterior colonização (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Vários estudos têm sugerido o envolvimento das BMPs no controle do desenvolvimento de células germinativas primordiais. A ausência de tais substâncias, em embriões de camundongos, promove falha no desenvolvimento das células germinativas primordiais (BMP-4: Lawson et al., 1999; BMP-8: Ying et al., 2000). Essa informação sugere também que as BMPs podem estar envolvidas na formação e no desenvolvimento dos folículos primordiais.

Imediatamente após a diferenciação das gônadas, por volta do 30º dia de gestação em bovinos (Rüsse, 1983), ocorre a transformação das células germinativas primordiais em oogônias meioticamente ativas, marcadas pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno, preparando a célula para a divisão meiótica. Após a replicação, as oogônias se diferenciam em oócitos primários ou imaturos, os quais sofrem uma parada no seu desenvolvimento (Suh et al., 2002), em prófase I, no estágio de diplóteno ou vesícula germinal. Neste estágio, o oócito é rodeado por uma única camada de quatro a oito células da pré-granulosa, constituindo a primeira categoria dos folículos pré-antrais, ou seja, os folículos primordiais (Fair, 2003), dando início ao processo de foliculogênese. Esses folículos aparecem no ovário fetal por volta de 90 dias em vacas (Rüsse, 1983) e aos 75 dias em ovelhas (McNatty et al., 1995; Sawyer et al., 2002). Já em humanos, todos os folículos primordiais são formados entre o sexto (180 dias) e o nono (270 dias) mês de gestação (Erickson e Williams, 2008).

A foliculogênese inicia-se com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo de *De Graaf* ou pré-ovulatório (Van den Hurk e Zhao, 2005). Este processo está dividido em duas fases: 1) a fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento de folículos primários e secundários e 2) a fase antral, por sua vez subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários e formação do folículo pré-ovulatório. No presente trabalho, apenas a primeira fase da foliculogênese será descrita com maiores detalhes.

Com a evolução folicular e após o recrutamento, os folículos pré-antrais iniciam uma série de mudanças morfofisiológicas que envolvem o crescimento e a diferenciação do oócito, bem como a proliferação e citodiferenciação das células da granulosa e o desenvolvimento das células da teca (Suh et al., 2002). Estes dois tipos de células somáticas são os locais de ação e síntese de uma série de hormônios que promovem uma complexa regulação do desenvolvimento folicular (Skinner, 2005).

Quando todas as células da pré-granulosa que circundam o oócito imaturo tornam-se cuboides, aumentando em número e volume, os folículos passam a ser chamados de primários (Van den Hurk et al., 1997). Durante todo o crescimento dos folículos primários, as células da granulosa sofrem proliferação, diferenciam e é observado um aumento no tamanho do oócito e no seu conteúdo proteico (Picton et al., 1998). Além disso, observa-se também aumento na expressão do RNAm de receptores para FSH em vacas (Bao e Garverick, 1998), ovelhas (Tisdall et al., 1995) e ratas (Presl et al., 1974). Esse estágio folicular aparece aos 140 dias em fetos de vacas (Rüsse, 1983) e aos 100 dias em ovelhas (McNatty et al., 1995; Sawyer et al., 2002). Nesta categoria folicular, a zona pelúcida (ZP) começa a ser formada circundando o oócito (Rankin et al., 2001). No entanto, na espécie humana, Gook et al. (2008) verificaram a presença das proteínas para ZP em folículos desde o estágio primordial, sugerindo que estas proteínas estão presentes desde o início da foliculogênese.

Os folículos alcançam o estágio secundário quando duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides estão circundando o oócito e quando as células da teca já se evidenciam no estroma circundante. Isto ocorre em fetos aos 120 dias em ovelhas (McNatty et al., 1995; Sawyer et al., 2002) e aos 210 dias em vacas (Rüsse, 1983).

Ativação e crescimento de folículos pré-antrais

A ativação do folículo primordial é caracterizada pela transformação das células da granulosa de sua forma pavimentosa para a forma cuboidal e consequente proliferação (Braw-Tal e Yossefi, 1997; Fair et al., 1997), seguida do aumento do diâmetro oocitário. Para entender o recrutamento ou a ativação dos folículos primordiais, é necessário conhecer algumas características destes folículos. Os folículos primordiais não são vascularizados, portanto não possuem suprimento sanguíneo próprio. Desta forma, precisam diretamente de uma perfeita interação (junções intercomunicantes ou *gap*) entre as células dos compartimentos foliculares (células da granulosa e oócito) e o estroma ovariano (Erickson e Williams, 2008). As junções *gap* facilitam a transferência de aminoácidos, glicose e nucleotídeos para o crescimento do oócito (Eppig, 1991). Segundo Boland et al. (1994), os folículos utilizam predominantemente a via glicolítica como forma de produção de ATP, pois os folículos pré-antrais parecem ser capazes de gerar energia suficiente em condições anaeróbicas. No entanto, para o crescimento normal, a maturação e a esteroidogênese, o metabolismo folicular exige a presença de oxigênio.

O processo de ativação folicular ocorre dias, meses, ou anos após o nascimento (Hirshfield, 1991). Assim, os fatores que estimulam a proliferação das células da granulosa são considerados semelhantes àqueles que promovem a ativação do folículo primordial. Dentre estes fatores, pode-se destacar a BMP-7 (Lee et al., 2001). O cultivo *in vitro* de células da granulosa de ratas na presença de BMP-7 resultou em um aumento da proliferação



destas células (Lee et al., 2001). Além disso, estes mesmos autores observaram uma redução no número de folículos primordiais com consequente aumento no número de folículos primários após injeção direta da BMP-7 na bursa ovariana de ratas. Estes achados sugerem que a estimulação dos folículos primordiais pela BMP-7 ocorre devido à promoção da mitose nas células da granulosa (Lee et al., 2001). Em outro trabalho mais recente, esta mesma equipe mostrou que o cultivo *in vitro* de ovários de ratas em meio adicionado de BMP-7, na presença de FSH, também promove este efeito, sugerindo, desta forma, um papel da BMP-7 na ativação folicular quando associada ao FSH (Lee et al., 2004).

Durante a fase de crescimento, os oócitos primários aumentam consideravelmente de tamanho, sendo detectados altos níveis de expressão de RNAm e acúmulo de ribossomos e polipeptídeos (Fair e Hyttel, 1997). Uma vez ativados, os folículos entram para o *pool* de folículos em desenvolvimento e posterior maturação. A abundância de mitocôndrias alongadas e em divisão e ainda a dos retículos endoplasmáticos liso e rugoso refletem o aumento da síntese de energia de que os oócitos necessitam para crescer e posteriormente maturar (Fair et al., 1997). Além disso, qualquer problema nesta fase de crescimento do oócito pode acarretar falhas no desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto (Fair e Hyttel, 1997).

População e atresia folicular ovariana

Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular e constituem o estoque de gametas femininos (Liu et al., 2001). Contudo, a grande maioria (99,9%) não chega à ovulação, pois é eliminada por um processo natural, denominado atresia ou morte celular (Figueiredo et al., 2008), fazendo com que o desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório a partir de um folículo primordial seja um evento biológico extremamente raro (Ireland, 1987).

A atresia pode ocorrer por via degenerativa (Saumande, 1981) e/ou apoptótica (Figueiredo et al., 1995), quando o ambiente parácrino ou endócrino não é apropriado para suportar o crescimento folicular e/ou a diferenciação das células da granulosa. (Silva et al., 2002). Apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz significativamente o número de oócitos presentes no ovário, diminuindo, assim, o potencial reprodutivo da fêmea mamífera. A atresia ocorre em todos os estádios foliculares, especialmente na fase antral, e vários fatores, como idade, aporte nutricional e estágio reprodutivo, podem afetar as taxas de atresia folicular (Ingram, 1962).

Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como, por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos neste estágio de desenvolvimento (Morita e Tilly, 1999).

O processo de atresia, seja por meio da degeneração ou da apoptose, é regulado principalmente por fatores endócrinos, como os hormônios foliculo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), fatores parácrinos, kit ligand (KL), fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF) e fibroblástico básico (FGFb), ativina e as BMPs. Desta forma, é provável que o balanço entre os fatores que promovem sobrevivência e aqueles que induzem à morte decidirá se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (Hsu e Hsueh, 2000).

Diante disso, visando evitar a perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* pela atresia, nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de elucidar os fatores e os mecanismos envolvidos no crescimento e na atresia folicular.

Estudo da foliculogênese *in vitro*

Apesar de muito já ser conhecido acerca da foliculogênese antral, na fase pré-antral, os fatores e os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados, sobretudo com relação ao crescimento de folículos primários e secundários. No entanto, vários estudos *in vitro* têm sido realizados com a finalidade de elucidar esse processo. Dentre esses estudos, destacam-se os trabalhos relacionados à Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA). Essa biotécnica tem como principal objetivo resgatar ou isolar do ambiente ovariano os folículos pré-antrais e cultivá-los *in vitro* com o intuito de assegurar o crescimento e desenvolvimento dos oócitos contidos no interior desses folículos até a completa maturação, prevenindo-os, assim, do processo natural de atresia folicular (Figueiredo et al., 2008).

Nos últimos anos, tem sido observado um considerável progresso no tocante ao crescimento e a maturação *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Utilizando o sistema de cultivo com fragmentos ovarianos (*in situ*), a BMP-7, por exemplo, favoreceu a ativação e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais de ratas (Lee et al., 2004). Este sistema apresenta como principais vantagens a manutenção da estrutura folicular e uma praticidade maior (Telfer, 1996). Outro sistema de cultivo bastante utilizado é o cultivo de folículos isolados. Em humanos (Roy e Treacy, 1993), caprinos (Huamin e Yong, 2000), bovinos (Itoh et al., 2002), ovinos (Arunakumari et al., 2007), suínos (Metoki et al., 2008) e bubalinos (Gupta et al., 2008), grandes folículos secundários isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até o estágio antral. Este sistema de cultivo permite maior perfusão do meio e melhor acompanhamento dos folículos que podem ser cultivados individualmente e em diferentes categorias (primordial, primário, secundário).

Apesar desses avanços, os resultados mais satisfatórios observados em animais domésticos até o presente momento foram relatados recentemente por Gupta et al. (2008) e Figueiredo et al. (2009), em búfalas e cabras, respectivamente, nas quais oócitos oriundos de foliculos secundários cultivados *in vitro* atingiram a maturação e foram fecundados *in vitro*, resultando posteriormente na produção de embriões. No entanto, resultados como esse não têm sido relatados com frequência, não se caracterizando ainda como uma rotina na biotécnica de MOIFOPA. Isso pode ser devido a diferenças existentes entre as metodologias empregadas pelas diferentes equipes, bem como às particularidades existentes entre as diferentes espécies animais.

Especificamente, com relação às metodologias e aos protocolos empregados, acredita-se que as diferentes substâncias adicionadas ao meio de cultivo, bem como o momento da adição e as concentrações das substâncias, são aspectos relevantes para a obtenção dos resultados satisfatórios no tocante ao desenvolvimento e à maturação *in vitro* de foliculos pré-antrais. Nesse sentido, diferentes fatores e substâncias têm sido amplamente estudados e empregados no cultivo *in vitro* de foliculos pré-antrais visando conhecer a ação sobre a foliculogênese na sua fase inicial. Dentre as substâncias, podem ser citadas as BMPs, que desempenham um importante papel no desenvolvimento folicular.

Influência das BMPs na regulação da foliculogênese inicial

A regulação do crescimento, a partir da proliferação celular e citodiferenciação de foliculos ovarianos, pode ser auxiliada por inúmeros fatores de crescimento sintetizados pelos compartimentos foliculares. No entanto, a função dos fatores que controlam o crescimento e desenvolvimento dos foliculos ainda não é bem compreendida, sendo, portanto, um ponto crítico da elucidação da fisiologia ovariana. Nesse contexto, observa-se uma grande importância de substâncias como as BMPs. Das 20 BMPs descritas até o momento (Massague e Wotton, 2000), apenas sete (BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 e -15) foram localizadas no ovário mamífero (Hogan, 1996; Dube et al., 1998; Wozney e Rosen, 1998). Estas proteínas são sinalizadas por moléculas extracelulares, expressas de maneira tecido-específica durante a embriogênese e a vida adulta dos animais, e estão envolvidas em múltiplos papéis na regulação do crescimento, na diferenciação e apoptose de vários tipos celulares, além de exercerem funções na foliculogênese e na ovulação (Glistler et al., 2004).

Caracterização estrutural

Os membros da superfamília TGF- β são sintetizados como uma pré-proteína que possui um peptídeo sinalizador, uma grande pró-região e uma região menor madura biologicamente ativa (Massague, 1990; Chang et al., 2002). Uma distinta característica estrutural desta superfamília é a presença de sete cisteínas conservadas, as quais estão envolvidas no dobramento da molécula em uma estrutura tridimensional chamada nó de cisteína (Schlunegger e Grütter, 1992; Griffith et al., 1996; Vitt et al., 2001). O papel da pró-região dos membros da superfamília TGF- β não é bem compreendido. No entanto, acredita-se que esta região possa ser importante para a correta dobra e dimerização da molécula, uma vez que a dimerização ocorre antes do processamento proteolítico para a liberação da região madura biologicamente ativa (Shimasaki et al., 2004). O único resíduo de cisteína conservado que não está envolvido na formação do nó de cisteína faz uma única ponte dissulfeto entre as duas subunidades. Isso resulta na formação de um dímero ligado covalentemente, que é crítico para posterior transdução do sinal e concretização de sua atividade biológica (Jones et al., 1994).

Estudos utilizando sistema de expressão de proteínas recombinantes revelaram que, quando co-expressas, as BMP-2, -4, -5, -6 (Fig. 1) e -7 (Fig. 2) podem formar heterodímeros, sendo uma característica interessante, que estes podem exibir maior atividade biológica que seus correspondentes homodímeros (Israel et al., 1996).

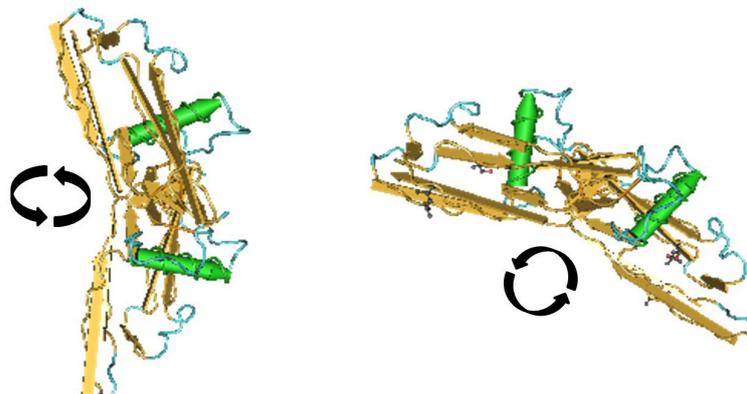


Figura 1. Estrutura cristalizada da Proteína Morfogenética Óssea-6 em dois ângulos diferentes. [mmdbId:22322 e mmdbId:22323]; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

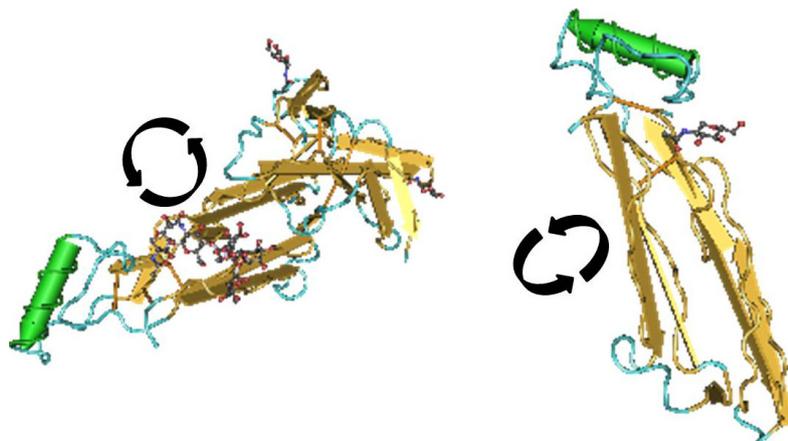


Figura 2. Estrutura cristalizada da Proteína Morfogênica Óssea-7 em dois ângulos diferentes. [mmdbId:22322 e mmdbId:22323]; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As BMPs interagem com duas classes de receptores transmembranários do tipo serina-treonina quinase, receptores de BMP tipo I e tipo II. Nos mamíferos, três receptores tipo I (BMPR-IA/activin-like receptor kinase-3 (Alk3), BMPR-IB/Alk6 e activin A receptor type I (ActRI/Alk2)) e três receptores do tipo II (BMPR-II, ActR-IIA e ActR-IIB) foram identificados (Knight e Glistler, 2003).

Expressão e Imunolocalização das BMPs no tecido ovariano

Diversos fatores de crescimento peptídeos, incluindo os membros da superfamília TGF- β , são expressos em oócitos, células da granulosa e células da teca, de acordo com o estágio de desenvolvimento do folículo. Estes fatores funcionam como moléculas reguladoras intraovarianas envolvidas no recrutamento folicular, na proliferação/atresia de células da granulosa e de células da teca, na esteroidogênese, na maturação oocitária, na ovulação e na luteinização (Knight e Glistler, 2003).

Vários genes de BMPs são expressos no ovário de mamíferos. O RNAm que codifica as BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 e -15 foi identificado em ovários de várias espécies (Lyons et al., 1989; Jaatinen et al., 1996; Takao et al., 1996; Dube et al., 1998; Shimasaki et al., 1999). Foram detectadas proteínas e/ou RNAm de membros da família BMP no tecido ovariano, incluindo BMP-2 e -6 em mulheres (Lyons et al., 1989) e ratas (Erickson e Shimasaki, 2003), e BMP-4, -5 e -6 em ovários de porcas recém-nascidas (Shimizu et al., 2004). A BMP-3 é expressa em células da granulosa-luteínicas humanas (Jaatinen et al., 1996). O GDF-9B/BMP-15 é expresso exclusivamente em oócitos (Elvin et al., 2000; McNatty et al., 2005). Já a BMP-6 é expressa em oócitos de camundongas (Elvin et al., 2000), vacas (Glistler et al., 2004) e nas células da granulosa e da teca de folículos ovarianos de vacas (Glistler et al., 2004). Ratas normais cíclicas expressam RNAm para BMP-4 e -7 na camada de células da teca da maior parte dos folículos do ovário (Shimasaki et al., 1999).

Com relação aos receptores, estudos identificaram que o RNAm para BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II é expresso em oócitos e células da granulosa (Shimasaki et al., 1999). Em ovelhas, os receptores de BMPs estão localizados nos oócitos, nas células da granulosa (tanto de folículos primários quanto antrais), nas células da teca (folículos antrais) e na superfície do epitélio ovariano (Wilson et al., 2001; Souza et al., 2002). O RNAm para BMPR-II foi detectado em células da granulosa e oócitos de folículos antrais em ratas (Shimasaki et al., 1999; Erickson e Shimasaki, 2003) e ovelhas (Wilson et al., 2001; Souza et al., 2002), sendo a expressão da proteína observada apenas nesta última. Do mesmo modo, a BMP-6 é uma proteína expressa no oócito (ovelha: Juengel et al., 2006; rata: Otsuka et al., 2001; vaca: Glistler et al., 2004; porca: Brankin et al., 2005b), nas células da granulosa (rata: Erickson e Shimasaki, 2003; vaca: Glistler et al., 2004 e porca: Brankin et al., 2005b) e nas células da teca (ovelha: Campbell et al., 2004; vaca: Glistler et al., 2004) de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento.

Estudos realizados utilizando a técnica de hibridização *in situ* demonstraram a presença de RNAm da BMP-7 em células da teca de folículos pré-ovulatórios de ratas (Shimasaki et al., 1999) e em células hipofisárias de camundongas transgênicas (Huang et al., 2001). Além disso, Huang et al. (2001), utilizando RT-PCR, identificaram o RNAm para a BMP-7 em células hipofisárias de camundongas.

Em vacas, foi detectada a expressão de RNAm do BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-IA, ActR-IIB e BMPR-II em todos os compartimentos de folículos antrais, no entanto a proteína BMPR-II foi encontrada somente nos oócitos de folículos antrais (Fatehi et al., 2005). Recentemente, foi demonstrada a expressão de proteínas das BMP-2 e -6 em oócitos suínos, líquido folicular e células da granulosa, e a expressão de BMP-2 em células da teca (Brankin et al., 2005b), além da expressão da proteína dos receptores de BMP (BMPR-IA, -IB e -II) em células da granulosa, células da teca e oócitos suínos (Quinn et al., 2004).

Estudos realizados em ratas demonstraram que os receptores da BMP-7 estão expressos nas células da granulosa de folículos a partir do estágio secundário, mostrando também que a proteína é expressa nas células da

teca (Shimasaki et al., 1999). Além disso, o RNAm para os receptores da BMP-6 (BMPR-IA, -IB e II) é expresso nos oócitos e nas células da granulosa de folículos caprinos (Silva et al., 2004) e de várias outras espécies mamíferas: camundonga (Elvin et al., 2000), rata (Shimasaki et al., 1999; Erickson e Shimasaki, 2003), ovelha (Souza et al., 2002; McNatty et al., 2005) e vaca (Glister e Knight, 2002), indicando possíveis efeitos autócrinos e/ou parácrinos.

Mecanismo de sinalização intracelular

As BMPs se ligam aos dois tipos de receptores, do tipo I e II. Uma vez que o complexo ligante-receptor é formado, o receptor do tipo II fosforila e ativa receptores do tipo I, que desencadeiam a sequência de eventos da via de sinalização das BMPs (Miyazono et al., 2001). Esta, por sua vez, ativa reguladores transcricionais chamados *Smads*, os quais convertem o sinal para o núcleo modificando a expressão gênica (Fig. 3). A via *Smad* é regulada pelo mediador *Smad-4* e pelos inibidores *Smad* (*Smad-6* e *-7*; ten Dijke e Hill, 2004). O complexo de proteínas *Smad* consiste em efetores nucleares e determina a sinalização por meio da ativação ou repressão dos genes alvo no núcleo e que alteram a atividade celular, incluindo o crescimento, a diferenciação e a síntese de matriz extracelular (von Bubnoff e Cho, 2001). As BMPs ativam as vias *Smad-1*, *-5* e *-8*, enquanto a ativina e o TGF- β ativam as vias *Smad-2* e *-3* (Miyazawa et al., 2002).

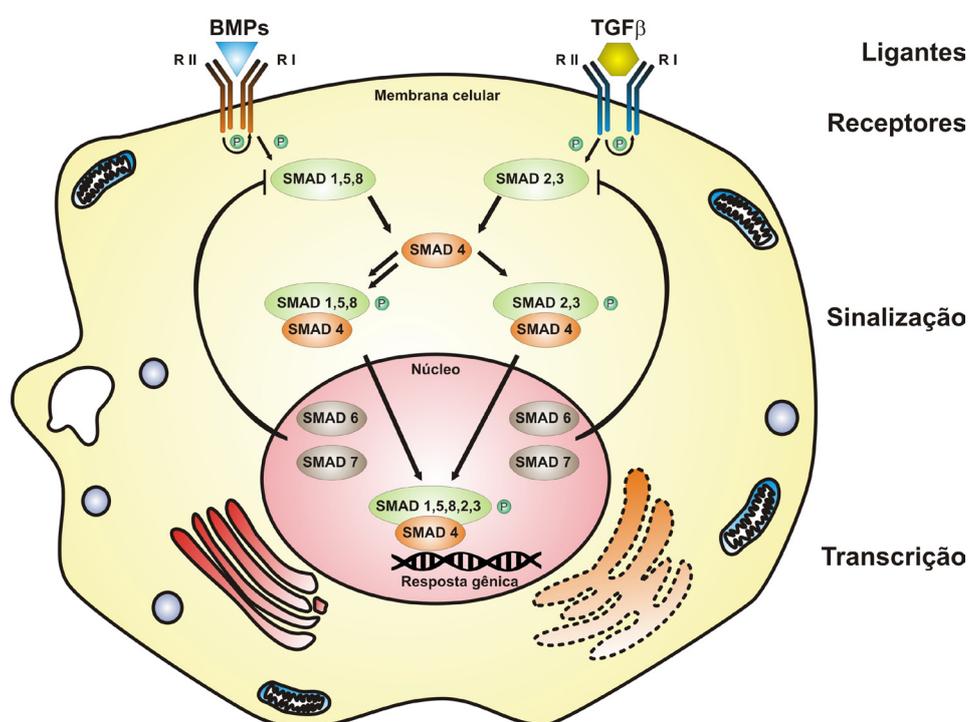


Figura 3. Ligantes, receptores, sinalização e transcrição de BMPs e TGF β . As BMPs são ligantes diméricos (com nó de cisteína em cada monômero) que interagem tanto com receptores tipo I (BMPR-I), quanto receptores tipo II (BMPR-II). Na cascata de sinalização, o receptor BMPR-II fosforila e ativa o receptor BMPR-I. A associação entre os receptores I e II resulta no complexo sinal-transdução. O complexo quinase BMP e BMPR-I fosforila os substratos de sinalização *Smad-1*, *-5* ou *-8*. As isoformas TGF β interagem com receptores distintos dos receptores de BMPs. O complexo quinase TGF β e BMPR-I fosforila os *Smad-2* ou *-3*. A fosforilação para ambos, BMPs e TGF β , é inibida e/ou modulada pelos *Smads* inibitórios *-6* e *-7*. Os *Smads-1*, *-5* ou *-8* que forem fosforilados interagem com o *Smad-4* e penetram no núcleo para ativar a maquinaria transcriptacional e desencadear a resposta dos genes de BMP. Os *Smads-2* ou *-3* associados ao *Smad-4* entram no núcleo e ativam a resposta dos genes de TGF β .

Efeitos das BMP-6 e -7 nas células ovarianas

Modelos de camundongas transgênicas *knockout* têm sido utilizados para investigar os efeitos *in vivo* das BMPs no ovário. Com isso, foi demonstrado que, na ausência de BMP-2, os animais têm um número reduzido de células germinativas primordiais em comparação com os seus homólogos de tipo selvagem (Ying e Zhao, 2001). Inversamente, as ratas sem o gene da BMP-6 parecem normais no que diz respeito à fertilidade e ao tamanho da ninhada, sugerindo que esta proteína pode não ser essencial para a fertilidade de murinos (Solloway et al., 1998).

Os efeitos da BMP-6 nos compartimentos foliculares já foram observados em várias espécies. Ao contrário



da BMP-15, a BMP-6 não estimula a proliferação de células da granulosa (ratas: Otsuka et al., 2001); além disso, inibe sua diferenciação (ovelhas: Juengel et al., 2006). Entretanto, em bovinos, Glister et al. (2004) verificaram um pequeno, porém significativo, aumento no número de células da granulosa após cultivo *in vitro* por seis dias em meio adicionado de BMP-6. Foi demonstrado também que esta proteína é importante na proliferação de células da granulosa e de células da teca em suínos (Brankin et al., 2005a). Adicionalmente, em vacas, as BMP-6 e -7 foram capazes de aumentar o número de células viáveis, a partir de um efeito mitogênico direto (Glister et al., 2004).

No tocante à BMP-7, Lee et al. (2001) observaram, a partir da injeção direta dessa proteína na bursa ovariana de ratas, o seu envolvimento no controle do crescimento oocitário, bem como na multiplicação das células da granulosa. Estudos *in vitro* mostraram que estas proteínas promovem a manutenção da viabilidade de ratas, camundongas e cabras, respectivamente (BMP-4: Nilsson e Skinner, 2003 e BMP-7: Lee et al., 2004, Araújo et al., 2010), bem como a ativação e o crescimento de folículos primordiais (BMP-4: Nilsson e Skinner, 2003; BMP-7: Lee et al., 2004). Além disso, a utilização da BMP-7 no cultivo de células da granulosa estimulou a proliferação destas células em vacas (Glister et al., 2004) e ratas (Lee et al., 2001).

Otsuka e Shimasaki (2002) observaram que a BMP-7 estimulou a síntese de DNA pelas células da granulosa de folículos primários cultivados *in vitro* e manteve esse estímulo quando as células da granulosa foram cultivadas juntamente com os oócitos. Por outro lado, quando células da granulosa foram cultivadas por dois ou seis dias em meio adicionado das BMP-2, -4, -6 ou -7, não foi observada nenhuma influência de tais substâncias na proliferação ou sobrevivência celular em ovelhas (Juengel et al., 2006). Adicionalmente, múltiplos fatores, incluindo o estágio de maturação ou número de células da granulosa dos folículos, as diferenças nas composições dos meios e períodos de cultivo, ou ainda a adição de outros hormônios e/ou fatores de crescimento, podem influenciar as respostas das células às diferentes BMPs utilizadas.

Efeitos das BMP-6 e -7 na esteroidogênese ovariana e na secreção de peptídeos

As BMP-4, -6 e -7 estimularam, em ratas, a produção de estradiol, inibina-A, ativina-A e folistatina (Lee et al., 2001). Em contraste, as referidas BMPs inibiram a secreção de progesterona pelas células da granulosa em ratas (Shimasaki et al., 1999; Lee et al., 2001; Otsuka et al., 2001), ovelhas (Juengel et al., 2006) e vacas (Glister et al., 2004). Por outro lado, a interação de BMP-6 e FSH não modificou a secreção de estradiol pelas células da granulosa em ratas (Miyoshi et al., 2007). A BMP-6 pode prevenir a luteinização prematura dos folículos potencialmente dominantes ou recrutáveis (Otsuka et al., 2001; Glister et al., 2004), sugerindo, desta maneira, que as moléculas inibitórias estão presentes no oócito. Esta função provavelmente é entendida pela observação dos sinalizadores de BMP-6 nas células da granulosa de folículos dominantes em ratas (Erickson e Shimasaki, 2003).

A reatividade das BMPs ao FSH foi associada ao aumento do número ou às alterações nas propriedades de seu receptor. Em outros estudos, foi observado que as BMP-6 e -7 aumentam a secreção de FSH nas células hipofisárias (Huang et al., 2001) e ainda que apenas a BMP-7 aumenta a expressão de receptores para FSH durante o cultivo de ovários de camundongas (Lee et al., 2004) modulando a ação do FSH (ratas: Otsuka et al., 2001), no sentido de aumentar a produção de estradiol e inibir a síntese de progesterona (Shimasaki et al., 1999). A habilidade das BMP-6 e -7 em estimular a síntese de FSH foi descrita pela primeira vez em cultivo de células hipofisárias derivadas de camundongas transgênicas. Esses resultados, combinados ao fato de que o RNAm destas BMPs foi detectado em células hipofisárias de camundongas, indicam que, além de as BMP-6 e -7 funcionarem como estimuladores de FSH, elas podem manter os níveis basais deste hormônio *in vivo* após utilização de anti-BMP-7 (Huang et al., 2001).

Considerações finais

A literatura mostra a participação das BMP-6 e -7 na modulação do desenvolvimento folicular e na função ovariana. Estas proteínas têm sido caracterizadas como importantes fatores que, associados a outros produzidos sistêmica ou localmente, podem atuar na manutenção da atividade ovariana, de forma a influenciar a esteroidogênese e retardar o início da atresia e/ou luteinização. Uma melhor compreensão acerca dos papéis destas proteínas no ovário poderá contribuir para elucidar os processos ligados à foliculogênese, bem como para auxiliar no desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* capazes de promover o crescimento e a maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais.

Referências

- Araújo VR, Silva CMG, Magalhães DM, Silva GM, Bão SN, Silva JRV, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. *Pesq Vet Bras*, v.30, p.305-310, 2010.
- Arunakumari G, Vagdevi R, Rao BS, Naik BR, Naidu KS, Humar RVS, Rao VH. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. *Small Rumin Res*, v.70, p.93-100, 2007.
- Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotrophin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci*, v.76, p.1466-1473, 1998.



- Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG.** Characterization of follicular energy metabolism. *Hum Reprod*, v.9, p.604-609, 1994.
- Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG.** BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol*, v.29, p.593-604, 2005a.
- 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, 2005b.
- Braw-Tal R, Yossefi S.** Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, v.109, p.165-171, 1997.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK.** Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.5-13, 2006.
- Campbell BK, De Souza CJH, Skinner A, Baird DT.** Effect of the FecB Mutation on the response of ovarian somatic cells to stimulation by bone morphogenetic proteins (BMP). In: Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 37, 2004, Vancouver, Canada. Lawrence, KS: Allen Press, 2004. abstr.772.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocr Rev*, v.23, p.787-823, 2002.
- Demeestere I, Centner J, Gervy Y, Delbaere A.** Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, v.130, p.147-156, 2005.
- Dooley CA, Attia GR, Rainey WE, Moore DR, Carr R.** Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production. *J Clin Endocrinol Metab*, v.85, p.3331-3337, 2000.
- 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.
- Elvin JA, Yan C, Matzuk MM.** Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol*, v.159, p.1-5, 2000.
- Eppig JJ.** Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays*, v.13, p.569-574, 1991.
- Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, Wigglesworth K.** Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod*, v.12, p.127-132, 1997. Abstract.
- Eppig JJ.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v.122, p.829-838, 2001.
- 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.1-20, 2003.
- Erickson GF, Williams CJ.** *Morphology and physiology of the ovary*. Endotext, Chapter 2, 2008.
- Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Boland M, Greve T.** Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anat Embryol*, v.195, p.327-336, 1997.
- Fair T, Hyttel P.** Oocyte growth in cattle-ultrastructure, transcription and developmental competence. In: Motta PM (Ed.). *Microscopy of reproduction and development: a dynamic approach*. Rome: Antonio Delfino Ed, 1997. p.109-118.
- Fair T.** Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.203-216, 2003.
- Fatehi AN, Van Den Hurk R, Colenbrander B, Daemen AJJM, Van Tol HTA, Monteiro RM, Roelen BAJ, 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, Hulshof SCJ, Thiry M, Van den Hurk R, Bevers MM, Nusgens B, Beckers JF.** Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. *Theriogenology*, v.43, p.845-858, 1995.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Editora Roca, 2008. p.303-327.
- Figueiredo JR.** et al. Ovário artificial de caprino produz 1º embrião “*in vitro*”. Fortaleza: CT & Inovação-UECE, 2009. Disponível em: Ovário artificial de caprino produz 1º embrião “*in vitro*”. Acesso em: 10 mai. 2010.
- 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.
- Glister C, Knight PG.** Immunocytochemical evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) signaling system in bovine antral follicles. *Reproduction Abstr Ser*, v.29, p.5, 2002. (Abstract 4).
- Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M.** Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Hum Reprod*, v.23, p.394-402, 2008.
- Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD.** Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.93, p.878-883, 1996.
- Gupta PSP, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP.** Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* growth preantral follicles. *Zygote*, v.16, p.57-63, 2008.
- Hirshfield AN.** Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, v.124, p.43-101, 1991.
- Hogan BL.** Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*, v.10, p.1580-1594, 1996.



- Hsu SY, Hsueh AJ.** Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm *Physiol Rev*, v.80, p.593-614, 2000.
- Huang HJ, Wu JC, Su P, Zhirnov O, Miller WL.** A novel role for morphogenetic proteins in the synthesis of Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrinology*, v.142, p.2275-2283, 2001.
- Huanmin Z, Yong Z.** *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v.54, p.641-650, 2000.
- Ingram DI.** Atresia. In: Zuckerman S (Ed.). *The ovary*. New York: Academic Press, 1962. p. 247-273.
- Ireland JJ.** Control of follicular growth and development. *J Reprod Fertil Suppl*, n.34, p.39-54, 1987.
- Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM.** Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors*, v.13, p.291-300, 1996.
- Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H.** Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol Reprod*, v.67, p.1099-1105, 2002.
- Jaatinen R, Rosen V, Tuuri T, Ritvos O.** Identification of ovarian granulosa cells as a novel site of expression for bone morphogenetic protein-3 (BMP-3/osteogenin) and regulation of BMP-3 messenger ribonucleic acids by chorionic gonadotropin in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, v.81, p.3877-3882, 1996.
- Jones WK, Richmond EA, White K, Sasak H, Kusmik W, Smart J, Oppermann H, Rueger DC, Tucker RF.** Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. *Growth Factors*, v.11, p.215-225, 1994.
- Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ, McNatty KP.** The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular developmental in sheep: contrast to rat. *Reproduction*, v.131, p.501-513, 2006.
- 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.
- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CVE, Korving J PWF, Hogan BLM.** BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*, v.13, p.424-436, 1999.
- Lee W-S, 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 W-S, Yoon S-J, Yoon T-K, Cha K-Y, Lee S-H, Shimasaki S, Lee S, Lee K-A.** 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.
- Liu J, Van der Elst J, Van den Broeck R, Dhont M.** Live offspring by *in vitro* oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. *Biol Reprod*, v.64, p.171-178, 2001.
- Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL.** Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev*, v.3, p.1657-1668, 1989.
- Massague J.** The transforming growth factor-b family. *Annu Rev Cell Biol*, v.6, p.597-641, 1990.
- Massague J, Wotton D.** Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*, v.19, p.1745-1754, 2000.
- McNatty KP, Smith P, Hudson NI, Heath Da, Tisdall Dj, W-S O, Braw-Tal R.** Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *J Reprod Fertil Suppl*, n.49, p.123-135, 1995.
- McNatty KP, Galloway SM, Wilson T, Smith P, Hudson NL, O'Connell A, Bibi AH, Heath DA, Davis GH, Hanrahan JP, Juengel JL.** Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol*, v.37, p.25-38, 2005.
- Metoki T, Iwatal H, Itoh M, Kasai M, Takajyo A, Suzuki A, Kuwayama T, Monji Y.** Effects of follicular fluids on the growth of porcine preantral follicle and oocyte. *Zygote*, v.16, p.239-247, 2008.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K.** Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signaling. *Genes Cells*, v.7, p.1191-1204, 2002.
- Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H.** Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*, v.187, p.265-276, 2001.
- Miyoshi T, Otsuka F, Inagaki K, Otani H, Takeda M, Suzuki J, Goto J, Ogura T, Makino H.** Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic protein in granulosa cells: Involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in Follicle-Stimulating Hormone-Induced estrogen production. *Endocrinology*, v.148, p.337-345, 2007.
- Morita Y, Tilly JL.** Oocyte apoptosis: like sand through and hourglass. *Dev Biol*, v.213, p.1-17, 1999.
- Nilsson EE, Skinner MK.** Bone morphogenetic protein-4 acts as a ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*, v.69, p.1265-1272, 2003.
- 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, 2001.
- Otsuka F, Shimasaki S.** A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulation cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.11, p.8060-8065, 2002.
- Picton H, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v.145, p.27-37, 1998.



- Presl J, Pospisil J, Figarova V, Krabec Z.** Stage-dependent changes in binding of iodinated FSH during ovarian follicle maturation in rats. *Endocrinol Exp*, v.8, p.291-298, 1974.
- Quinn RL, Shuttleworth G, Hunter MG.** Immunohistochemical localisation of the bone morphogenetic protein receptors in the porcine ovary. *J Anat*, v.205, p.15-23, 2004.
- Rankin TI, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J.** Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, v.128, p.1119-1126, 2001.
- Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-790, 1993.
- Rüsse I.** Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, v.24, p.77-92, 1983.
- Ruutiainen K, Adashi EY.** Intraovarian factors in hyperandrogenism. *Semin Reprod Endocrinol*, v.11, p.324-328, 1993.
- Saumande J.** Ovogenèse et folliculogênese. *Rec Med Vét*, v.157, p.29-38, 1981.
- Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield St. J, McNatty KP.** Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod*, v.66, p.1134-1150, 2002.
- Schlunegger MP, Grütter MG.** An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor- β 2. *Nature*, v.358, p.430-434, 1992.
- Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N.** A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.96, p.7282-7287, 1999.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF.** The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, v.25, p.72-101, 2004.
- Shimizu T, Yokoo M, Miyake Y, Sasada H, Sato E.** Differential expression of bone morphogenetic protein 4-6 (BMP-4,-5, and -6) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) during ovarian development in neonatal pigs. *Domest Anim Endocrinol*, v.27, p.397-405, 2004.
- Silva JRV, Ferreira MAL, Costa SHF, Santos RR, Carvalho FCA, Rodrigues APR, Lucci CM, Bão SN, Figueiredo JR.** Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Rumin Res*, v.43, p.203-209, 2002.
- 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. *Genetics, Gene Regulation, and Expression. Mol Reprod Dev*, v.70, p.1-19, 2004.
- Skinner MK.** Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, v.11, p.461-471, 2005.
- Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BLM, Robertson EJ.** Mice lacking BMP-6 function. *Dev Genet*, v.22, p.321-339, 1998.
- Souza CJ, Campbell BK, McNeill AS, Baird DT.** Effect of bone morphogenetic protein2 (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.
- Suh CS, Sonntag B, Erickson GF.** The ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev Endocr Metab Disord*, v.3, p.5-12, 2002.
- Takao M, Hino J, Takeshita N, Konno Y, Nishizawa T, Matsuo H.** Identification of rat bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b), a new member of BMP-3. *Biochem Biophys Res Commun*, v.219, p.656-662, 1996.
- Telfer EE.** The development of methods for isolation and culture of preantral follicles preantral. *Theriogenology*, v.45, p.101-110, 1996.
- Ten Dijke P, Hill CS.** New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*, v.29, p.265-273, 2004.
- Tisdall DJ, Watanabe K, Hudson NL, Smith P, McNatty KP.** FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Mol Endocrinol*, v.15, p.273-281, 1995.
- Van den Hurk R, Bevers MM, Becker JF.** *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v.47, p.73-82, 1997.
- Van Den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, 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 KW.** Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*, v.239, p.1-14, 2001.
- Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA.** Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod*, v.64, p.1225-1235, 2001.
- Wozney JM, Rosen V.** Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop*, v.346, p.26-37, 1998.
- Ying Y, Liu X-M, Marble A, Lawson KA, Zhao G-Q.** Requirement of BMP8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol*, v.14, p.1053-1063, 2000.
- Ying Y, Zhao Y.** Cooperation of endoderm derived BMP-2 and extraembryonic ectoderm derived BMP-4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol*, v.232, p.484-492, 2001.
- Zhu G, Guo B, Pan D, Mu Y, Feng S.** Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.275-283, 2008.