



Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seu papel na regulação da oogênese e da foliculogênese ovariana em mamíferos

The bone morphogenetic proteins (BMPs) and its role in the regulation of ovarian folliculogenesis and oogenesis in mammalian

J.J.N. Costa, M.J. Passos, E.L. Rebouças, J.R.V. Silva¹

Núcleo de Biotecnologia de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, Brasil.

¹Correspondência: roberto_viana@yahoo.com

Resumo

O processo de foliculogênese é controlado por uma variedade de gonadotrofinas e de fatores de crescimento locais, que agem em conjunto para regular a formação e o desenvolvimento dos folículos ovarianos. Dentre esses fatores, destacam-se as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que representam uma família de fatores de crescimento amplamente estudados e que se caracterizam por controlar as funções ovarianas em diferentes estágios do desenvolvimento folicular. Dessa forma, a presente revisão tem como foco principal descrever os locais de expressão das BMPs dos tipos 2, 4, 6, 7 e 15 e discutir o papel delas, bem como das gonadotrofinas FSH e LH durante a foliculogênese em mamíferos.

Palavras-chave: fatores de crescimento, folículos ovarianos, proteínas morfogenéticas ósseas.

Abstract

The process of folliculogenesis is controlled by a variety of gonadotropins and local growth factors that act together to regulate formation and development of ovarian follicles. Among these factors, the bone morphogenetic proteins (BMPs) represent a family of growth factors widely studied that have important functions at different stages of ovarian follicular development. Thus, this review aims to describe the local of expression and to discuss the role of BMPs 2, 4, 6, 7 and 15 as well as the gonadotropins FSH and LH during folliculogenesis in mammals.

Keywords: bone morphogenetic proteins, growth factors, ovarian follicles.

Introdução

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário e proporciona um ambiente ideal para que ocorram os processos de crescimento e maturação oocitária (Cortvrindt e Smitz, 2001). A foliculogênese e a maturação oocitária são processos complexos de desenvolvimento, por meio dos quais um folículo pré-ovulatório é formado a partir do crescimento de folículos primordiais.

A foliculogênese é regulada por um equilíbrio entre fatores extra e intraovarianos (Artini et al., 2007). Já a oogênese é profundamente dependente de fatores intraovarianos, em especial fatores presentes no fluido folicular (Hsieh et al., 2009; Padhy et al., 2009), que estão positivamente relacionados com os níveis desses fatores no soro sanguíneo (Qiao e Feng, 2011). Qualquer desequilíbrio ou disfunção entre os fatores extra e intraovarianos pode resultar na foliculogênese anormal e na desordem na oogênese (Frank et al., 2008). Uma série de diferentes fatores séricos, juntamente com o microambiente do fluido intrafolicular, pode prejudicar diretamente o potencial de desenvolvimento do oócito, caso o seu equilíbrio seja alterado (Artini et al., 2007; Padhy et al., 2009), o que teria, conseqüentemente, um impacto negativo sobre a fecundação, o desenvolvimento embrionário e a evolução da gestação (Qiao e Feng, 2011).

O eixo hipotálamo-hipófise-ovário é um complexo sistema neuro-hormonal, responsável pela secreção regulada de hormônios ovarianos e pela liberação cíclica de oócitos fertilizáveis na ovulação (Schwartz, 2000). Sendo a ovulação acionada pelo pico de LH pré-ovulatório, induzido pelos efeitos de *feedback* positivo com estrógeno no meio do ciclo (Herbison, 2008). Esse aumento hormonal induz a expressão sequencial de uma série de genes no ovário (Hernandez-Gonzalez et al., 2006), que finalmente leva à liberação do complexo *cumulus*-oócito (COC) para o espaço periovariano (Gayta et al., 2009).

Dentre os fatores de crescimento largamente estudados, estão as proteínas morfogenéticas ósseas, as BMPs, que são membros da superfamília de fatores de crescimento transformante- β (TGF- β). As BMPs são reguladoras de uma série de processos fisiológicos diretamente ligados às funções dos folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. O efeito cooperativo entre fatores de crescimento, como os pertencentes ao sistema BMP e as gonadotrofinas (FSH e LH), regula de forma harmoniosa todo o ciclo reprodutivo feminino (Yoshino et al., 2011). Cada uma dessas citocinas possui diferentes padrões de expressão e, conseqüentemente um efeito específico no ovário. A BMP-2 é encontrada nas células da granulosa de folículos primários, secundários e,



antrais em ovários de ratas (Erickson e Shimasaki, 2003), além de estar presente também nas células da teca de folículos antrais bovinos (Fatehi et al., 2005). Já a BMP-4 é conhecida por ser um potente regulador essencial para gametogênese em múltiplas fases de desenvolvimento, além de promover a proliferação de células germinativas primordiais (CGPs). A proteína morfogenética óssea do tipo 6 está presente em oócitos de todas as categorias foliculares, em diferentes espécies (murinos: Erickson e Shimasaki, 2003; bovinos: Glistler et al., 2004; ovinos: Juengel e McNatty, 2005; caprinos: Silva et al., 2006), agindo diretamente nos processos de proliferação celular. A BMP-7, por sua vez, é conhecida por promover a ativação e o crescimento de folículos primordiais em camundongos (Lee et al., 2004), enquanto a BMP-15, que é derivada do oócito, exerce um papel-chave em diferentes aspectos do desenvolvimento folicular (Wu et al., 2007b), que serão evidenciados ao longo deste artigo.

Desse modo, a presente revisão irá apresentar e discutir a localização das BMPs dos tipos 2, 4, 6, 7 e 15 e seus diferentes papéis na regulação da oogênese e da foliculogênese, bem como de seus receptores, que são os receptores de BMP dos tipos I e II (BMPR-I e BMPR-II).

Superfamília dos fatores de crescimento transformante β (TGF- β)

A superfamília TGF- β consiste em mais de 35 membros, incluindo TGF- β s, BMPs, fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), ativinas, inibinas, substância de inibição mulleriana (MIS) e nodal (Kingsley, 1994; Shimasaki et al., 2004).

Uma característica estrutural da superfamília TGF- β é a presença de sete cisteínas conservadas, que estão envolvidas no dobramento da molécula em uma única estrutura tridimensional chamada nó de cistina. Um resíduo de cisteína conservado que não está envolvido na formação do nó de cistina faz uma ponte dissulfeto entre as duas subunidades. Isso resulta na formação de dímeros ligados covalentemente, que é essencial para a atividade biológica dessas proteínas (Vitt et al., 2001).

Membros da superfamília TGF- β são sintetizados como proteínas precursoras de grandes dimensões, compostas por uma sequência sinal aminoterminal, um domínio e um pró-domínio maduro (domínio carboxiterminal; Chang et al., 2002). O sinal aminoterminal orienta o precursor para uma via de sinalização, onde as proteínas são clivadas por uma enzima proteolítica para gerar a proteína dimérica biologicamente ativa e madura. O pró-domínio variável pode facilitar a dimerização, sendo importante no processamento da proteína e na regulação dos membros da superfamília TGF- β . A sinalização da superfamília TGF- β é regulada em vários níveis, incluindo ligação e processamento dos ligantes extracelulares e interações intracelulares dos receptores (Di Pasquale et al., 2006; Dixit et al., 2006).

A superfamília TGF- β atua por meio de uma família de receptores transmembranares do tipo serina/treonina/quinase, conhecidos como os receptores para a superfamília TGF- β . Esses receptores são divididos em duas subfamílias: receptores do tipo I e do tipo II. Os dois tipos de receptores possuem propriedades estruturais semelhantes, cada um compreendendo um domínio extracelular, um pequeno domínio transmembranar e um grande domínio intracelular do tipo serina/treonina/quinase (Otsuka, 2010).

A família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)

As BMPs podem ser classificadas em vários subgrupos, incluindo grupo das BMP-2 e 4, grupo das BMP-5, 6, 7 e 8 e grupo das BMP-9, 10 e 15. As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) têm sido implicadas no crescimento e na remodelação de vários tecidos (Reddi, 1997), sendo originalmente identificadas por sua atividade de induzir a formação de ossos e cartilagens (Wozney, 1989). À medida que o padrão de expressão das BMPs foi descrito em vários tecidos e as suas proteínas tornaram-se disponíveis comercialmente, observou-se que as BMPs também controlam os processos de formação das células germinativas primordiais, de formação das células gonadotróficas na hipófise, bem como do crescimento e da maturação folicular em ovários de camundongos fêmeas (Shimasaki et al., 2004). Estudos recentes têm revelado que as BMPs têm uma grande variedade de efeitos sobre vários tipos de células, incluindo monócitos, células epiteliais, células mesenquimais e células neuronais. As BMPs regulam o crescimento, a diferenciação, a quimiotaxia e a apoptose dessas células e desempenham um papel central na morfogênese de vários tecidos e órgãos (Kawabata et al., 1998), desde invertebrados a humanos (Lembong et al., 2008). Várias BMPs têm sido descritas como reguladores autócrinos e parácrinos do desenvolvimento de folículos ovarianos. Dentre elas, destacam-se as BMPs dos tipos 2, 3, 4, 6, 7 e 15 (Shimasaki et al., 1999; 2004). Algumas BMPs já foram identificadas no útero de roedores (Li et al., 2007). Além disso, em ratas, a localização de BMPs 2, 4, 6 e 7 sugere vários papéis dessas proteínas durante a gestação (Ying e Zhao, 2000).

Receptores e vias de sinalização

O sistema TGF- β /BMP normalmente atua de modo parácrino, secretando ligantes que irão interagir com receptores nas células vizinhas (Lembong et al., 2008). Para exercer suas funções biológicas, as BMPs interagem

com dois tipos de receptores (I e II) presentes na superfície celular (Chang et al., 2002). Receptores do tipo I e do tipo II são glicoproteínas de aproximadamente 55 kDa e 70 kDa, respectivamente, que interagem durante a ligação. Inicialmente, as BMPs se ligam a receptores do tipo II (BMPR-II); em seguida, o receptor do tipo IA (BMPR-IA) ou o do tipo IB (BMPR-IB) são recrutados, sendo fosforilados, induzindo a uma resposta intracelular. As regiões extracelulares desses receptores contêm cerca de 150 aminoácidos com 10 ou mais cisteínas que determinam o dobramento da região. Uma característica única dos receptores do tipo I é uma região intracelular de 30 aminoácidos imediatamente anterior ao domínio da quinase. Esse trecho de 30 aminoácidos é chamado de domínio GS por causa da sequência SGSGSG contida nessa região (Wrana et al., 1994). A ligação induz a fosforilação do domínio GS no receptor tipo I pelo receptor tipo II, sendo necessária para a ativação da sinalização (Wieser et al., 1995). Os receptores do tipo I receberam nomes diferentes; por exemplo, receptor de ativina semelhante à quinase 4 (ALK4) é comumente conhecido como receptor de ativina do tipo IB (ActR-IB) porque pode se ligar à ativina e mediar respostas em células cultivadas (Attisano et al., 1996). Já o receptor de BMP do tipo IA (BMPR-IA) e o receptor de BMP do tipo IB (BMPR-IB) são também conhecidos como receptor de ativina semelhante à quinase 3 (ALK3) e receptor de ativina semelhante à quinase 6 (ALK6), respectivamente. O receptor de ativina semelhante à quinase 8 (ALK8) é um receptor tipo I para BMP-2b e BMP-7, que é essencial para o desenvolvimento em peixes-zebra (Bauer et al., 2001). Devido à promiscuidade do receptor do tipo I para diferentes ligantes da superfamília TGF- β na maioria dos casos, a nomenclatura mais adequada é provavelmente a ALK.

Em ovários de ratas, a expressão dos RNAs mensageiros para BMPR-II, BMPR-IA e BMPR-IB foi demonstrada em oócitos e células da granulosa de folículos primordiais, primários, secundários e antrais. No entanto, as células da teca de folículos de ratas expressam somente os RNAs mensageiros para BMPR-IA e BMPR-IB (Erickson e Shimasaki, 2003). Em caprinos, já foi demonstrada a expressão de BMPR-II, BMPR-IA e BMPR-IB em folículos primordiais, primários e secundários, bem como em oócitos, células da granulosa e da teca de folículos antrais (Silva et al., 2004; Costa et al., 2012; Lima et al., 2012).

Apesar de os receptores tipo II e tipo I participarem da transdução da sinalização intracelular das BMPs, a ligação aos receptores e a atividade sinalizante de certos ligantes são reguladas por correceptores. O glicosilfosfatidilinositol (GPI), ligado à família de proteínas de orientação repulsiva molecular (RGM), que incluem as RGM-a, b e c, é correceptor para BMP-2 e BMP-4 e reforça a sinalização das BMPs (Samad et al., 2005). Xia et al. (2007) afirmaram que RGM-b e c também são conhecidos como DRAGON e hemojuvelina, respectivamente, interagem com os receptores de BMP do tipo I e ou do tipo II, ligam-se à BMP-2 e à BMP-4, mas não à BMP-7 e à TGF- β 1. Nas células musculares lisas da artéria pulmonar de camundongos, a sinalização de BMP-2/4 exige o receptor BMPR-II, mas não o ActR-IIA ou o ActR-IIB. No entanto, células transfectadas com RGM-a usam tanto BMPR-II quanto ActR-IIA para a sinalização BMP-2/4, sugerindo que RGM-a facilita o uso de ActR-IIA pela BMP-2/4 (Xia et al., 2007). Os receptores, bem como seus respectivos mensageiros intracelulares, estão relacionados na Tab. 1.

Tabela 1. Fatores, Receptores e Smads da família TGF - β .

Fator	Receptor tipo II	Receptor tipo I	Smads
BMP-2	BMPR-II	ALK-3 (BMPR-IA)	Smad 1/5/8
BMP-4	BMPR-II	ALK-6 (BMPR-IB)	
BMP-6	ActR-II	ALK-2 (ActR-IA)	Smad 1/5/8
BMP-7	ActR-IIB	ALK-6 (BMPR-IB)	
BMP-15	BMPR-II	ALK-6 (BMPR-B)	Smad 1/5/8

A interação entre os receptores induz a fosforilação de mensageiros intracelulares (SMADs), que são deslocados para o núcleo celular, onde regulam a expressão de genes específicos (Massagué, 2000). Resumidamente, as BMPs dos tipos 2, 4, 6, 7 e 15 fosforilam várias categorias de mensageiros, ou seja, receptores regulados (R-SMADs), as SMAD-1, SMAD-5 e SMAD-8. Uma vez fosforilados, os R-SMADs formam um complexo heterotrimérico transcricional, com um SMAD correceptor, a SMAD-4, que se transloca ao núcleo e atua como fator de transcrição ligando-se de forma direta a sítios de ligação específicos nos promotores dos genes-alvo (Ohta et al., 2008; Miyazono et al., 2010), ou a outros fatores de transcrição (Lembong et al., 2008), ativando ou inibindo a expressão de um gene (Massagué et al., 2005). Mudanças transcricionais induzidas controlam uma variedade de processos celulares envolvidos na regulação tecidual (Lembong et al., 2008). O mecanismo de atuação das BMPs pode ser visto na Fig. 1.

Proteínas SMADs são componentes intracelulares das vias de transdução de sinal da superfamília TGF- β . O primeiro membro dessa família é a proteína Mothers Against Decapentaplegic (MAD), que foi identificada em *Drosophila melanogaster* (Sekelsky et al., 1995). Outros membros dessa família foram identificados com base na sua homologia com MAD. Três homólogos da MAD encontrados em *Caenorhabditis elegans* foram nomeados como sma-2, sma-3 e sma-4, porque a mutação nos seus respectivos genes impede o desenvolvimento

do animal, com o terceiro estágio larval com tamanho corporal menor do que o tipo selvagem (Savage et al., 1996). Os homólogos de *sma* e *MAD* encontrados no vertebrados são chamados de SMADs, uma combinação de *SMA* e *MAD* (Derynck et al., 1996). Pelo menos em 10 animais vertebrados, as proteínas SMADs foram identificadas até o momento (Massagué e Chen, 2000). A sinalização TGF- β /BMP *in vivo* pode ser controlada por meio de anticorpos que reconhecem as SMADs fosforiladas, pois a via de sinalização apresenta-se de forma altamente conservada em todas as espécies (Lembong et al., 2008). A localização intracelular de fosfo-SMAD1/5 passa do núcleo para o citoplasma durante a diferenciação de CGPs em oogônias e revela a existência de fatores intrínsecos ao oócito que regulam negativamente a sinalização BMP durante o desenvolvimento. Além disso, a imunolocalização dos receptores de BMP e fosfo-SMAD-1/5 identificou as células da granulosa como alvo da ação das BMPs (Childs et al., 2010). Em camundongos, as proteínas SMAD1/5/8 fosforiladas foram também detectadas em oócitos e células de granulosa em todas as fases do desenvolvimento folicular, incluindo folículos primordiais. No entanto, nenhuma diferença na expressão das SMAD1/5/8 fosforiladas foi encontrada nas diferentes fases do ciclo estral em ovários de camundongos fêmeas, bem como no corpo lúteo, nas células estromais, nas células da teca e nas células epiteliais da superfície do ovário, sugerindo que a sinalização da BMP é também ativa nessas células (Tanwar e McFarlane, 2011).

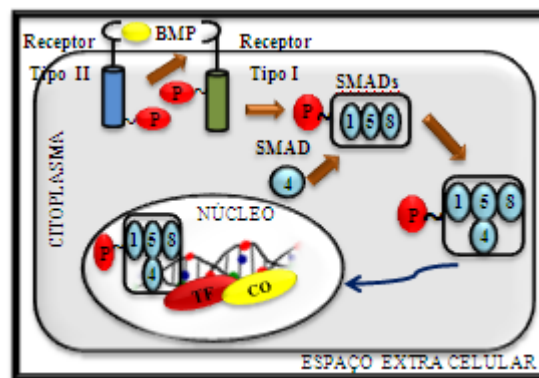


Figura 1. Via de sinalização das BMPs. As BMPs se ligam inicialmente ao receptor tipo II, que sofre fosforilação, e recruta o receptor tipo I, que também é fosforilado. Em seguida, o receptor tipo I promove a fosforilação do complexo SMADs 1, 5 e 8 que se unem a SMAD 4, formando um complexo SMAD 1, 5, 4, 8, que é direcionado ao núcleo, ligando-se aos fatores de transcrição (TF) e co-reguladores (CO) inibindo ou ativando a expressão gênica.

Mutações nas SMAD-2, SMAD-3 e SMAD-4 foram encontradas em tumores humanos, o que sugere que esses genes funcionam como supressores de tumor *in vivo* (Massagué, 1998). Por exemplo, SMAD-4, em humanos, também conhecida como DPC4 (deletado em carcinoma pancreático *locus* 4), é frequentemente deletada ou mutante em cânceres pancreáticos (Hahn et al., 1996).

A via de sinalização das BMPs é controlada em diferentes níveis por reguladores positivos e negativos. No nível extracelular, os antagonistas de BMP interferem na ligação do ligante com os receptores de BMP. Um importante antagonista extracelular das BMPs é o Noggin. A estrutura cristalina do complexo Noggin-BMP-7 demonstrou que a ligação de Noggin aos receptores de BMP inibe a ligação das BMPs aos epítomos dos receptores dos tipos I e II. A expressão de Noggin é potencialmente induzida pela atividade das BMPs e, assim, contribui para o mecanismo de *feedback* negativo, controlando a ação das BMPs *in vivo* (Song et al., 2010).

Proteína morfogenética óssea do tipo 2 (BMP-2)

A expressão dos RNAs mensageiros para BMP-2 foi demonstrada em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais presentes em ovários de ratas (Erickson e Shimasaki, 2003). Em bovinos, a proteína BMP-2 também foi demonstrada em células da teca e em oócitos de folículos antrais (Fatehi et al., 2005). Em humanos, estudos recentes detectaram a presença dessa proteína em células da granulosa de folículos antrais (Shi et al., 2011). Segundo Juengel et al. (2006b), por meio da técnica de hibridização *in situ* em ovários ovinos, não foi possível a detecção do RNAm para BMP-2 em células da granulosa, células da teca, células do *cumulus* ou oócitos de folículos não atresícos em nenhuma categoria folicular. Já folículos antrais atresícos expressam o RNAm para BMP-2 em células da granulosa que estão nos estágios finais de degeneração (Juengel et al., 2006b).

Com relação aos efeitos das BMPs em folículos ovarianos, estudos *in vitro* com células da granulosa de ovinos demonstraram que a BMP-2 aumenta a produção de estrógeno e inibina-A após estimulação com FSH, promovendo, assim, a diferenciação das células da granulosa *in vitro* (Souza et al., 2002). Shi et al. (2011)



afirmaram que BMP-2 aumenta a expressão do receptor do FSH e da aromatase e diminui a expressão do receptor de LH e da enzima esteroidogênica StAR em células da granulosa de humanos; dessa forma, há uma inibição da luteinização precoce. Ainda em humanos, foi observado que a BMP-2 aumenta a secreção de inibina-B em células da granulosa cultivadas *in vitro* (Jaatinen et al., 2002). Além disso, a BMP-2 suprime a síntese de estradiol, progesterona e androstenediona e estimula a proliferação de células da teca de suínos (Brankin et al., 2005).

Em bovinos, a adição de BMP-2 durante a maturação *in vitro* de complexo *cumulus*-oócito não influencia o processo de expansão das células do *cumulus*, de maturação oocitária, nem a formação e a qualidade dos blastocistos após fertilização *in vitro* (Fatehi et al., 2005). Análises da expressão gênica utilizando a técnica de qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real), em folículos antrais bovinos, demonstraram que a BMP-2 é mais expressa nas células da granulosa do que em células da teca (Glistler et al., 2010). Em ratas, BMP-2 suprime o AMPc, inibindo a síntese de progesterona, e estimula a síntese de estradiol via p38-MAPK, sugerindo um papel nos eventos que antecedem a maturação folicular, tais como síntese de esteroides e inibinas (Inagaki et al., 2009). A análise por qRT-PCR mostrou que a expressão de BMP-2 aumenta durante a transição da fase de proliferação de células germinativas primordiais (CGPs; 8-9 semanas) para o estágio de diferenciação meiótica (14-16 semanas). A expressão de SMAD-1 aumenta, e SMAD-5 diminui no mesmo período, indicando uma mudança em ambos os ligantes e no mediador de sinalização associada a esses estágios de desenvolvimento (Childs et al., 2010).

Foi demonstrado por Inagaki et al. (2009) que a BMP-2 nas concentrações de 10, 30 e 100 ng/mL aumenta a produção de estradiol induzida por FSH (30 ng/mL) pelas células da granulosa e não altera a produção de estradiol induzida por forskolina. Em contraste, BMP-2 nas mesmas concentrações inibe a produção de progesterona induzida por FSH, bem como por forskolina, entretanto os efeitos não foram detectados quando foi realizado o cocultivo entre células da granulosa e oócito. A expressão da aromatase P450 induzida por FSH foi ligeiramente aumentada na presença de BMP-2 em células da granulosa isoladas. Já na presença do oócito, a BMP-2 aumenta significativamente os níveis de RNAm de aromatase P450 induzida por FSH. Os níveis de RNAm para a proteína StAR induzida por FSH foram diminuídos na presença de BMP-2, entretanto não foi detectado nenhum efeito sobre os níveis de StAR durante o cocultivo de células da granulosa e oócitos. Nas células da granulosa, o aumento da produção de AMPc induzida por FSH (30 ng/mL) foi tempo-dependente, tendo sido observada uma redução na produção de AMPc induzida por FSH. Além disso, o acúmulo de AMPc induzida por FSH e por forskolina (10 μ M) por 48 h de cultivo foi diminuído pela presença de BMP-2, independentemente da presença do oócito. Em células da granulosa cultivadas, a BMP-2 (100 ng/mL) aumenta significativamente a fosforilação de p38, uma proteína mitogênica, induzida por FSH, e seus efeitos foram maiores quando foram combinadas BMP-2 e BMP-4 na presença de oócitos. A BMP-2 regula a esteroidogênese induzida por FSH não só estimulando a sinalização p38 MAPK induzida por FSH, mas também pela a supressão da via AMPc induzida por FSH nas células da granulosa, por meio da comunicação oócito-células da granulosa, desempenhando, assim, um papel fundamental no desenvolvimento folicular normal (Inagaki et al., 2009).

Ho e Bernard (2009) demonstraram que a BMP-2 induz a fosforilação de SMAD 1/5 e promove um aumento na expressão da subunidade β do FSH em células gonadotróficas. No útero, a BMP-2 está presente na área decidual em locais de implantação e desempenha um papel na decidualização *in vitro* (Li et al., 2007). De forma importante, foi detectado que a presença de BMP-2 no útero de camundongos resulta em decidualização ineficaz e interrupção da gestação (Lee et al., 2007).

Proteína morfogenética óssea do tipo 4 (BMP-4)

A sinalização de BMP-4 causa o aumento da expressão de genes nas células germinativas, bem como induz a multiplicação dessas células. O aumento dessa atividade corresponde a um evento importante para a especiação e diferenciação das células germinativas (Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000; Ying e Zhao, 2001). A BMP-4 é uma reguladora essencial da gametogênese em múltiplas fases de desenvolvimento, sendo capaz de promover a proliferação de células germinativas primordiais (CGPs) isoladas de fetos humanos (8-20 semanas) e cultivadas *in vitro* com 100 ng/mL de BMP-4. Além disso, a expressão de BMP-4 diminuiu durante a transição da proliferação de CGPs (8-9 semanas) à diferenciação meiótica (14-16 semanas). BMP-4 exerce um papel central na formação das células germinativas primordiais em embriões de camundongos; em camundongos knockout, que não expressam BMP-4, observou-se ausência de CGPs nas gônadas (Lawson et al., 1999). Foi demonstrado ainda que BMP-4 causa um aumento significativo na expressão de genes em células germinativas e parece ser necessária para a diferenciação de células-tronco embrionárias de humanos (hESCS) em células germinativas (West et al., 2010).

Existem evidências de que as BMPs produzidas localmente exercem um papel importante na diferenciação das células gonadotróficas da hipófise (Scully e Rosenfeld, 2002). Já foi demonstrado que o aumento da expressão do antagonista de BMPs, Noggin, causa uma interrupção no desenvolvimento da hipófise, resultando na ausência de quase todos os tipos de células endócrinas, incluindo as células gonadotróficas que



produzem o FSH e o LH (Treier et al., 1998). Além disso, BMP-4 interage com a ativina e com o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) para modular a secreção de FSH (Lee et al., 2007; Nicol et al., 2008). A expressão de SMAD-1 aumentou, e SMAD-5 diminuiu no mesmo período, indicando uma mudança em ambos os ligantes e no mediador de sinalização durante o desenvolvimento embrionário (8–9 e 14–16 semanas; Childs et al., 2010). West et al. (2010) demonstraram que a Noggin é apta a inibir o crescimento de células germinativas em sistemas de cultivo.

No tocante aos folículos ovarianos, os RNA mensageiros e as proteínas para BMP-4 são expressos em células da teca de ratas (Erickson e Shimasaki, 2003). Já em bovinos, a BMP-4 foi demonstrada em células da granulosa e da teca (Glister et al., 2004), bem como em oócitos de folículos antrais (Fatehi et al., 2005). Tanwar e McFarlane (2011) detectaram uma forte expressão da BMP-4 em todas as fases do desenvolvimento folicular em todo o ciclo estral de camundongos fêmeas. Além disso, folículos pré-antrais e antrais apresentaram uma forte coloração para BMP-4 em oócitos e células da granulosa. Uma forte coloração também foi observada no corpo lúteo e nas células estromais que circundam os folículos (Tanwar e McFarlane, 2011).

Em estudos com folículos antrais, foi observado que, durante o cultivo de células da granulosa provenientes desses folículos, a BMP-4 potencializa a ação do FSH aumentando a produção de estradiol e inibindo a síntese de progesterona em ratas (Shimasaki et al., 1999) e ovelhas (Mulsant et al., 2001). Já em humanos, foi demonstrado que existe uma inter-relação entre o sistema BMP e o FSH, sendo que as BMPs inicialmente inibem expressão de receptores do FSH, enquanto o FSH estimula a sinalização endógena de BMPs. Esse equilíbrio é importante para a manutenção e o desenvolvimento das células da granulosa (Miyoshi et al., 2006). Ainda em humanos, a BMP-4 desempenha um papel crucial no crescimento de folículos primários para secundários e antrais (Gougeon, 2010). Em bovinos, a BMP-4 aumenta a produção de estradiol, inibina-A e folistatina após estímulo pelo fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1) e inibe a produção de progesterona em resposta ao IGF-1 (Glister et al., 2004), assim como inibe a apoptose de células da granulosa via survivina (Kayamori et al., 2009). Para entender como a BMP-4 inibe a produção de progesterona pelas células da granulosa de ovinos, Pierre et al. (2004) demonstraram que a BMP-4 diminui a expressão dos genes regulados pelo AMP cíclico (AMPc), da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) e da enzima de clivagem de cadeia lateral do colesterol P450 (P450 scc). Dessa forma, a BMP-4 atua como inibidor da luteinização precoce de células da granulosa de folículos antrais, possibilitando o seu crescimento até o estágio de folículo pré-ovulatório (Shimasaki et al., 2004). A BMP-4 promove a transição folicular de primordial para primário e o anticorpo anti-BMP-4 reduz acentuadamente o número de folículos primordiais em ratas (Nilsson e Skinner, 2003).

No tocante aos efeitos da BMP-4 nos estágios finais de maturação oocitária, Fatehi et al. (2005) relataram que a adição de BMP-4 durante a maturação do complexo *cumulus*-oócito *in vitro* não afeta os processos de expansão das células do *cumulus* e de maturação oocitária, bem como a formação e a qualidade dos blastocistos após fertilização *in vitro* de bovinos.

Em células da granulosa, BMP-4 tem contribuído para redução dos níveis de apoptose *in vitro*. Shimizu et al. (2012) demonstraram que a BMP-4 inibe a apoptose das células da granulosa via PI3K/PDK-1/PKC. Após 48 h de cultivo, o tratamento combinado de 50 ng/mL de BMP-4 e BMP-7 também diminuiu significativamente a porcentagem de apoptose das células da granulosa. A BMP-4 não afeta a expressão de bcl-xL ou bax, que são genes pró-apoptóticos, além de estimular a expressão do RNAm para survivina (Kayamori et al., 2009). Foi detectado também um aumento da apoptose em CGPs, o qual reduziu o número dessas células em ovários fetais humanos tratados com 100 ng/mL de BMP-4 (Childs et al., 2010).

Inagaki et al. (2009) demonstraram que a BMP-4, em diferentes concentrações (10, 30 e 100 ng/mL), aumenta a produção de estradiol induzida por FSH (30 ng/mL) pelas células da granulosa e não altera a produção de estradiol induzida por forskolina. Além disso, as mesmas concentrações de BMP-4 (10, 30 e 100 ng/mL) inibem a produção de progesterona induzida por FSH, bem como por forskolina. Entretanto, os efeitos não foram detectados quando foi realizado o cocultivo entre células da granulosa e oócito (Inagaki et al., 2009).

Proteína morfogenética óssea do tipo 6 (BMP-6)

Em bovinos, a BMP-6 atua nas células da granulosa estimulando a sua proliferação, promovendo viabilidade celular e aumentando a produção de inibina-A, ativina-A e folistatina (Leitão et al., 2009). Estudos anteriores demonstraram, com a utilização da técnica de hibridização *in situ* em ovários ovinos, a expressão do RNAm codificando BMP-6 em oócitos de todas as categorias foliculares, entretanto o RNAm para BMP-6 não foi percebido em células da granulosa ou da teca em nenhuma das categorias foliculares (Juengel et al., 2006b). Em caprinos, a proteína para BMP-6 é expressa em oócitos de folículos ovarianos em todos os estágios de desenvolvimento (Silva et al., 2006), bem como em células da granulosa e da teca de várias espécies (murinos: Erickson e Shimasaki, 2003; bovinos: Glister et al., 2004; ovinos: Juengel e McNatty, 2005). Segundo Frota et al. (2011b), a quantificação por PCR em tempo real do RNAm para BMP-6 em folículos primários e secundários é significativamente maior do que aquelas observadas em folículos primordiais caprinos. Estudos com imuno-



histoquímica demonstraram a presença da proteína BMP-6 em oócitos de todas as categorias foliculares e nas células da granulosa e do *cumulus* em folículos primários e secundários. Comparada ao cultivo de folículos secundários em α -MEM, a adição de BMP-6, de FSH ou uma mistura de BMP-6 e FSH aumentou significativamente o diâmetro folicular. No tocante à formação de antro, houve um aumento significativo quando BMP-6 e FSH foram adicionados ao meio de cultura (Frota et al., 2011b).

Para exercer suas funções biológicas, a BMP-6 interage com dois tipos (I e II) de receptores presentes na superfície celular (Massagué e Chen, 2000). Silva et al. (2004) demonstraram que os receptores das BMPs são expressos em todos os tipos de folículos ovarianos na espécie caprina. Além disso, foi relatada a expressão desses receptores em folículos ovarianos em camundongos (Shimasaki et al., 2004).

Após o cultivo de células da granulosa de folículos antrais de camundongos, observou-se que a BMP-6 inibe a síntese de progesterona, por meio da inibição de enzimas esteroidogênicas. Além disso, a BMP-6 inibe a expressão de receptores de LH (Otsuka et al., 2001). A BMP-6 atua retardando o processo de diferenciação folicular, proporcionando o rápido crescimento do folículo por meio da multiplicação das células da granulosa, depois diminui drasticamente durante a seleção do folículo dominante, sendo que essa redução pode estar relacionada com o mecanismo pelo qual os folículos dominantes são selecionados (Shimasaki et al., 2004).

O tratamento com BMP-6 (2, 10 e 50 ng/mL) reduz de maneira dose-dependente os níveis de secreção de progesterona (P4) induzida por forskolina em células da granulosa luteinizadas e em células da teca, sem afetar o número de células viáveis no fim do período de cultivo. O tratamento de células da granulosa com BMP-6 diminuiu os níveis de expressão de CYP11A1 induzida por forskolina em cerca de 40%, mas não teve efeitos significativos sobre os níveis de transcrição de StAR e 3β -HSD, na presença ou ausência de forskolina. A BMP-6 também aumenta a expressão basal do RNAm para CYP17A1 em cerca de cinco vezes. A folistatina na concentração de 500 ng/mL reverte parcialmente o efeito supressor de BMP-6 na secreção de P4 em células da granulosa e em células da teca. Além disso, a BMP-6 diminui a secreção de ativina-A na presença de forskolina (Kayani et al., 2009) e fator altera a expressão de CYP19A1 em células da granulosa de suínos, controlando, assim, a esteroidogênese durante o desenvolvimento oocitário e folicular (Ebeling et al., 2011).

Proteína morfogenética óssea do tipo 7 (BMP-7)

A proteína BMP-7, também conhecida como proteína osteogênica-1, é produzida pelas células da teca de folículos secundários e antrais (Shimasaki et al., 2004). A BMP-7 exerce suas funções biológicas interagindo preferencialmente com o receptor de ativina-IA ou receptor BMPR-IB, além do receptor de ativina-IIA ou de BMPR-II (Shimasaki et al., 2004). Em folículos fetais humanos, o RNAm para BMP-7 e seus receptores BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II foram expressos em células da granulosa, oogônias e oócitos (Abir et al., 2008).

Durante o cultivo de folículos pré-antrais caprinos, a BMP-7 foi capaz de manter a sobrevivência folicular durante um período de sete dias, preservando a integridade ultraestrutural dos folículos (Araújo et al., 2010). Na mesma espécie, Frota et al. (2011a) detectaram que, em folículos antrais, os níveis de RNAm para BMP-7 são significativamente maiores em células da granulosa murais/teca de grandes folículos antrais (>3mm) do que de pequenos folículos antrais (<3mm). Durante o cultivo, a adição de BMP-7 (50 ng/mL), FSH (50 ng/mL) ou a combinação de ambos aumentou significativamente o crescimento folicular e a formação de antro (Frota et al., 2011a).

Em folículos de mulheres adultas, a expressão de RNAm para BMP-7 foi restrita às células da granulosa, o RNAm para BMPR-IA foi detectado em células da granulosa e oócitos, já o RNAm para BMPR-IB em oócitos, enquanto a expressão do RNAm para BMPR-II esteve ausente. Estudos *in vitro* também demonstraram que a BMP-7, na concentração de 100 ng/mL, promove a ativação e o crescimento de folículos primordiais, bem como aumenta a expressão de receptores para FSH (FSH-R) durante o cultivo de ovários de camundongos por quatro dias (Lee et al., 2004). Além disso, Shi et al. (2010) demonstraram que a BMP-7 aumenta a expressão do mRNA para o FSH-R em células da granulosa humanas, mas diminui a expressão do mRNA para o LH-R. Dessa forma, a proteína BMP-7 pode atuar na maturação folicular inibindo a luteinização precoce em células da granulosa de humanos. Em folículos ovinos, a BMP-7 foi detectada em todos os compartimentos celulares (Juengel et al., 2006a). No cultivo *in vitro* de folículos, a BMP-7 promoveu a ativação e o crescimento de folículos primordiais (Lee et al., 2001). Lee et al. (2001) injetaram BMP-7 (1 μ g/mL) no interior da bolsa ovariana de ratas e caracterizaram as alterações na foliculogênese, ovulação e esteroidogênese. Foi detectado, ainda, que BMP-7 reduziu o número de folículos primordiais e aumentou o número de folículos primários, secundários e antrais, indicando que a BMP-7 promoveu a ativação e o crescimento dos folículos primordiais. Além disso, a administração da BMP-7 promove mitose nas células da granulosa e inibe a produção de progesterona. Considerando-se que a progesterona é importante para o processo de ovulação (Yoshimura e Wallach, 1987), a inibição da produção de progesterona pela BMP-7 pode estar relacionada com os mecanismos de inibição da ovulação.

Durante o cultivo *in vitro* de células da granulosa de rata, foi observado que a BMP-7 modula a ação do FSH, aumentando a produção de estradiol e inibindo a síntese de progesterona. A BMP-7 foi um dos primeiros



fatores a ser identificado com ação biológica na promoção da inibição da luteinização em células da granulosa (Shimasaki et al., 1999). A BMP-7 aumenta a expressão da enzima P450 aromatase favorecendo a produção de estradiol, bem como a transição folicular a partir do estágio primário (Lee et al., 2001; Gougeon, 2010). Segundo Shi et al. (2012), o fator de crescimento e diferenciação 3 (GDF-3), que é conhecido como um inibidor do sistema BMP, aumenta a expressão do RNAm para o receptor de LH, estimulando, assim, o processo de luteinização. Esta é uma ação antagonista à da BMP-7, que suprime a expressão de mRNA para o receptor de LH em células da granulosa (Shi et al., 2012).

Ainda em células da granulosa, demonstrou-se uma redução nos níveis de apoptose durante o cultivo dessas células em meio suplementado com 50 ng/mL de BMP-7 (Kayamori et al., 2009). Recentemente, foi demonstrado que a BMP-7 inibe a apoptose das células da granulosa via sinalização PI3K/PDK-1/Akt (Shimizu et al., 2012). Quando se avaliaram os genes relacionados com a apoptose *bcl-xL* ou *bax*, durante o cultivo de células da granulosa na presença de BMP-7, verificou-se que a expressão desses genes não foi afetada, enquanto a expressão do RNAm para *survivina* foi estimulada. No tocante à expressão de RNAm de *XIAP*, uma proteína inibidora da apoptose, a BMP-7, aumentou significativamente a sua expressão, enquanto o tratamento com 50 ng/mL de BMP-7 diminuiu significativamente a expressão de *caspase-3* e *caspase-9* ativadas (Kayamori et al., 2009).

Proteína morfogenética óssea do tipo 15 (BMP-15)

A BMP-15 é um fator de crescimento derivado do oócito e tem papel-chave em diferentes aspectos do desenvolvimento folicular, incluindo recrutamento do folículo primordial, proliferação das células da granulosa e células da teca, atresia e esteroidogênese (Wu et al., 2007b). Devido a sua homologia com o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), essa proteína é conhecida também como GDF-9B e está diretamente relacionada com o controle da fertilidade feminina e das funções ovarianas (Paulini e Melo, 2011). A BMP-15 é sintetizada como um pré-pró-peptídeo precursor, contendo um peptídeo sinal, um pró-domínio e um domínio maduro (Chang et al., 2002). Na BMP-15, o resíduo de cisteína conservado é substituído por serina, e os dímeros são formados por meio de interações não covalentes. Foi verificado que a BMP-15 poderia se ligar aos vários receptores de células da granulosa, como *BMPR-II*, receptor de ativina tipo II, *ALK-2* e *ALK-6*. Desses receptores, *ALK-6* é o mais eficiente na ligação à BMP-15, e *BMPR-II* é mais eficaz na bioatividade de BMP-15 (Wu et al., 2007b). A BMP-15 primeiramente se liga ao receptor BMP tipo IB e recruta o receptor BMP tipo II (Shimasaki et al., 2004). Silva et al. (2004), utilizando a técnica de imuno-histoquímica, demonstraram a presença do RNA mensageiro para BMP-15, *BMPR-IA*, *BMPR-IB* e *BMPR-II* em folículos primordiais, primários, secundários, bem como no oócito e nas células da granulosa de folículos antrais caprinos. Além disso, Lima et al. (2012) quantificaram a expressão dos receptores para BMP-15 (*BMPR-IB* e *BMPR-II*) em todos os estágios do desenvolvimento folicular na espécie caprina.

O gene BMP-15 está localizado no cromossomo X, e ratas com o gene para BMP-15 deletado apresentam disfunções nas células do *cumulus* (Yan et al., 2001). Estudos genéticos estão trazendo evidências de que a BMP-15 é um importante fator produzido pelo oócito que pode regular as funções de células somáticas em ovários de ratas (Yan et al., 2001; Hanrahan et al., 2004; Su et al., 2004, 2008; McNatty et al., 2005; McIntosh et al., 2008). A BMP-15 foi encontrada em oócitos de todos os tipos de folículos e células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais caprinos, mas não em folículos primordiais (Silva et al., 2006). Essa proteína também desempenha um papel central no desenvolvimento do folículo e da fertilidade normal em mamíferos, pois é um mitógeno para as células da granulosa, inibe a luteinização, além de promover a maturação do oócito (Wu et al., 2007a). Comparando a expressão de BMP-15 em bezerras e vacas adultas, Hosoe et al. (2011) detectaram que os maiores níveis de RNAm foram encontrados em células do *cumulus* de vacas adultas. A BMP-15 mostrou-se expressa principalmente no oócito de folículos primários avançados de roedores, ovinos e humanos (McNatty et al., 2003; Shimasaki et al., 2004; Di Pasquale et al., 2004; Juengel e McNatty, 2005). Pela técnica de Western Blot, a BMP-15 foi detectada no fluido folicular (Wu et al., 2007b). Foi demonstrado, mediante estudos *in vitro*, que a BMP-15 desempenha também um papel fundamental na regulação das funções por meio dos processos de mitose, proliferação, apoptose, luteinização, metabolismo e expansão por sinalização mitogênica e transdução (Qiao e Feng, 2011), além de participar da maturação oocitária, ovulação e formação do corpo lúteo. Crawford e McNatty (2012) demonstraram que os níveis de RNAm para BMP-15 e GDF-9 (ambos produzidos pelo oócito) são altamente correlacionados, tanto em espécies monovulvatórias como em poliovulvatórias (camundongos fêmeas, ratas, porcas, vacas, ovelhas e corças), sugerindo que os dois genes para esses fatores de crescimento são firmemente coregulados.

Galloway et al. (2000) afirmaram que a BMP-15 é essencial nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular (transição de primordial para primário), promovendo proliferação das células da granulosa e prevenindo diferenciação. Folículos com níveis elevados de BMP-15 apresentaram morfologia normal, alta taxa de clivagem e um maior número de embriões viáveis. Além disso, a BMP-15 é capaz de manter a baixa incidência de apoptose em células do *cumulus* (Wu et al., 2007b).

Estudos realizados com células da granulosa de ratas demonstraram que a BMP-15 recombinante



(100 ng/mL) estimula a proliferação dessas células independentemente do FSH, mas diminui os efeitos do FSH no que se refere à produção de progesterona, sem afetar a produção de estradiol (Otsuka et al., 2000). Nessa mesma concentração (100 ng/mL), a BMP-15 é capaz de estimular a expressão do *Kit ligand* (KL) nas células da granulosa de ratas (Otsuka e Shimasaki, 2002), além de estimular a expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células do *cumulus* de camundongos fêmeas (Yoshino et al., 2006). Já a adição de BMP-15 (50 ng/mL) no cultivo de folículos secundários caprinos foi capaz de promover o crescimento folicular e a formação da cavidade antral, além de manter a integridade ultraestrutural, após 18 dias de cultivo (Lima et al., 2012). Foi sugerido, em estudos com ovelhas, que a BMP-15 é requerida para o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios (Juengel et al., 2002).

Diferentes eventos relacionados ao desenvolvimento folicular foram influenciados positivamente com a adição da BMP-15 durante o cultivo de folículos pré-antrais caprinos, desde a ativação dos folículos primordiais, a proliferação e diferenciação das células da granulosa, bem como a formação de antro e manutenção da sobrevivência folicular (Moore et al., 2003; Juengel e McNatty, 2005; Celestino et al., 2011; Lima et al., 2012). Assim, a BMP-15 é considerada como sendo um fator-chave obrigatório para a fertilidade feminina de diferentes espécies de mamíferos e já foi demonstrado que a deleção do gene BMP-15 induz a ocorrência de patologias diretamente relacionadas à atividade reprodutiva, tais como síndrome dos ovários policísticos e falha ovariana prematura. A BMP-15 recombinante humana tem um grande potencial nas tecnologias de reprodução assistida para o tratamento da infertilidade (Li et al., 2009).

Dados de PCR em tempo real detectaram que, em folículos cultivados, houve uma diminuição significativa dos níveis de transcritos de BMP-15, sendo demonstrada, ainda, uma diminuição de até cinco vezes nos níveis de RNAm para BMP-15 durante o desenvolvimento folicular. Já os níveis de transcritos de BMP-15 diminuíram significativamente em até 2,5 vezes, enquanto os níveis de transcritos para BMP-15 encontrados em oócitos *in vivo* foram semelhantes àqueles obtidos após oito dias de cultivo *in vitro* (Sánchez et al., 2009).

Oócitos recuperados de folículos com altos níveis de BMP-15 no fluido folicular apresentaram maior taxa de fertilização, clivagem e melhor qualidade no desenvolvimento do embrião. A BMP-15 apresentou uma correlação positiva com os níveis de estradiol (E2) e uma correlação negativa com as concentrações de FSH no fluido folicular. Ela pode servir como um indicador da maturidade do citoplasma de oócitos (Wu et al., 2007a), bem como inibir a ação estimulante de FSH na gravidez associada à produção da proteína plasmática-A (PAPP-A) de maneira dose-dependente. Além disso, BMP-15 e FSH, por meio do controle da expressão de PAPP-A em células da granulosa, desempenham um papel na seleção do folículo dominante e na maturação dos oócitos (Wu et al., 2007a).

Considerações finais

Esta revisão mostra que as BMPs exercem importantes funções no controle da oogênese e da foliculogênese e regulam as diferentes etapas da produção de oócitos maduros e hormônios de origem ovariana. O conhecimento aprofundado e a identificação desse grupo de fatores de crescimento proteicos que podem atuar isoladamente ou combinados e até mesmo modular o efeito de hormônios sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos constitui uma ferramenta fundamental para a pesquisa e elucidação da foliculogênese mamífera, além de trazer benefícios para as mais variadas técnicas de reprodução, seja animal ou humana.

Referências

- Abir R, Garor R, Felz C, Nitke S, Krissi H, Fisch B. Growth hormone and its receptor in human ovaries from fetuses and adults. *Fertil Steril*, v.90, p.1333-1339, 2008.
- Araújo VR, Silva CMG, Verde IBL, Magalhães DM, Silva GM, Name, KPO, Bão SN, Campelo CC, Silva JRV, Tavares LMT, Figueiredo R, Rodrigues AP. Effect of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on in vitro survival of caprine preantral follicles. *Braz J Vet Res*, v.30, p.305-310, 2010.
- Artini PG, Monteleone P, Toldin MRP, Matteucci C, Ruggiero M, Cela V, Genazzani AR. Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. *Expert Rev Endocrinol Metab*, v.2, p.215-223, 2007.
- Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massagué J. Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol*, v.16, p.1066-1073, 1996.
- Bauer H, Lele Z, Rauch GJ, Geisler R, Hammerschmidt M. The type I serine/threonine kinase receptor Alk8/Lost-a-fin is required for Bmp2b/7 signal transduction during dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development*, v.128, p.849-858, 2001.
- 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, 2005.
- Celestino JJH, Lima-Verde IB, Bruno JB, Matos MHT, Chaves RN, Saraiva MVA, Silva CMG, Faustino LR, Rossetto R, Lopes CAP, Donato MAM, Peixoto CA, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on in vitro development and



- survival of preantral follicles. *Mol Cell Endocrinol*, v.338, p.1-9, 2011.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*, v.23, p.787-823, 2002.
- Childs AJ, Kinnell HL, Collins CS, Hogg K, Bayne RAL, Green SJ, McNeilly AS, Anderson RA.** BMP signalling in the human fetal ovary is developmentally-regulated and promotes primordial germ cell apoptosis. *Stem Cells*, v.28, p.1368-1378, 2010.
- Cortvrindt R, Smitz, J.** In vitro Follicle Growth: Achievements in Mammalian Species. *Reprod Dom Anim*, v.36, p.3-9, 2001.
- Costa JJN, Passos MJ, Leitão CCF, Vasconcelos GL, Saraiva MVA, Figueiredo JR, van den Hurk R, Silva JRV.** Levels of mRNA for bone morphogenetic proteins, their receptors and SMADs in goat ovarian follicles grown in vivo and in vitro. *Reprod Fertil Dev*, v.24, p.723-732, 2012.
- Crawford JL, McNatty KP.** The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Mol Cell Endocrinol*, v.348, p.339-343, 2012.
- Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massagué J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF.** Nomenclature: vertebrate mediators of TGF- β family signals. *Cell*, v.87, p.173-173, 1996.
- 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.
- Ebeling S, Töpfer D, Weitzel JM, Meinecke B.** Bone morphogenetic protein-6 (BMP-6): mRNA expression and effect on steroidogenesis during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Reprod Fertil Dev*, v.23, p.1034-1042, 2011.
- Erickson GF, Shimasaki S.** The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol*, v.1, p.9, 2003.
- Fatehi AN, Van den Hurk R, Colenbrander B, Daemen AJ, Monteiro RM, Roelen BA, Bevers MM.** Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP-2 and BMP-4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, v.63, p.872-889, 2005.
- Frank S, Stark J, Hardy K.** Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, v.14, p.367-378, 2008.
- Frota IMA, Leitão CCF, Costa JJN, Van Den Hurk R, Brito IR, Saraiva MVA, Figueiredo JR, Silva JRV.** Effects of BMP-7 and FSH on the development of goat preantral follicles and levels of mRNA for FSH-R, BMP-7 and BMP receptors after in-vitro culture. *Anim Reprod*, v.8, p.25-31, 2011a.
- Frota IMA, Leitão CCF, Costa JJN, Van Den Hurk R, Saraiva MVA, Figueiredo JR, Silva JRV.** Levels of BMP-6 mRNA in goat ovarian follicles and in vitro effects of BMP-6 on secondary follicle development. *Zygote*, 2011b. Doi:10.1017/S0967199411000542.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O.** Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, v.25, p.279-283, 2000.
- Gayta F, Gayta M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B, Garrido N, Sánchez-Criado JE, Millar RP, Pellicer A, Fraser HM, Tena-Sempere M.** KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.296, p.E520-E531, 2009.
- 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, Satchell L, Knight PG.** Changes in expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine antral follicle development: inhibin can antagonize the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. *Reproduction*, v.140, p.699-712, 2010.
- Gougeon A.** Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol*, v.7, p.132-143, 2010.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE.** DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18. *Science*,



v.271, p.350-353, 1996.

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.

Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: The case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev*, v.57, p.277-287, 2008.

Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Shimada M, Wayne CM, Ochsner SA, White L, Richards JS. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol*, v.20, p.1300-1321, 2006.

Ho CC, Bernard DJ. Bone morphogenetic protein 2 signals via BMPRI1A to regulate murine follicle-stimulating hormone beta subunit transcription. *Biol Reprod*, v.81, p.133-141, 2009.

Hosoe M, Kaneyama K, Ushizawa K, Hayashi K-G, Takahashi T. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, v.9, p.33-41, 2011.

Hsieh M, Zamah AM, Conti M. Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Semin Reprod Med*, v.27, p.52-61, 2009.

Inagaki K, Otsuka F, Miyoshi T, Yamashita M, Takahashi M, Goto J, Suzuki J, Makino H. p38-mitogen-activated protein kinase stimulated steroidogenesis in granulosa cell-oocyte cocultures: role of bone morphogenetic proteins 2 and 4. *Endocrinology*, v.150, p.1921-1930, 2009.

Jaatinen R, Bondestam J, Raivio T, Hilden K, Dunkel L, Groome N, Ritvos O. Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin beta (B) - subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, p.1254-1261, 2002.

Juengel JL, Heath DA, Quirke LD, McNatty KP. O estrogen receptor α and β , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localization within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reprod Fertil*, v.131, p.81-92, 2006a.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod*, v.67, p.1777-1789, 2002.

Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the ovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod*, v.11, p.144-161, 2005.

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 development in sheep: contrast to rat. *Reproduction*, v.131, p.501-513, 2006b.

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, v.9, p.49-61, 1998.

Kayamori T, Kosaka N, Miyamoto A, Shimizu T. The differential pathways of bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 in the suppression of the bovine granulosa cell apoptosis. *Mol Cell Biochem*, v.323, p.161-168, 2009.

Kayani AR, Glister C, Knight PG. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular-luteal transition in cattle. *Reproduction*, v.137, p.67-78, 2009.

Kingsley DM. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, v.8, p.133-146, 1994.

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CVE, Korving JPWFM, 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 KB, Khivansara V, Santos MM, Lamba P, Yuen T, Sealfon SC, Bernard DJ. Bone morphogenetic protein 2 and activin A synergistically stimulate follicle-stimulating hormone beta subunit transcription. *J Mol Endocrinol*, v.38, p.315-330, 2007.

Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod*, v.65, p.994-999, 2001.

Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SK, 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.

Leitão CCF, Brito IR, Frota IMA, Silva JRV. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Acta Sci Vet*, v.37, p.215-224, 2009.

Lembong JMA, Yakoby N, Shvartsman SY. Spatial Regulation of BMP Signaling by patterned receptor expression. *Tissue Eng Part A*, v.14, p.1469-1477, 2008.

Li H, Dai K, Tang T, Zhang X, Yan M, Lou J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*, v.356, p.836-842, 2007.

Li Q, Rajanahally S, Edson M, Matzuk MM. Stable expression and characterization of N-terminal tagged



- recombinant human bone morphogenetic protein15. *Mol Hum Reprod*, v.15, p.779-788, 2009.
- Lima IMT, Brito IR, Rossetto R, Duarte ABG, Rodrigues GQ, Saraiva MVA, Costa JJJ, Donato MAM, Peixoto CA, Silva JRV, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the in vitro effects of BMP-15 on preantral follicle development. *Cell Tissue Res*, v.348, p.225-238, 2012.
- Massagué J.** How cells read TGF- β signals. *Nat Rev*, v.1, p.169-178, 2000.
- Massagué J.** TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem*, v.67, p.753-791, 1998.
- Massagué J, Chen YG.** Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev*, v.14, p.627-644, 2000.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D.** Smad transcription factors. *Genes Dev*, v.19, p.2783-2810, 2005.
- McIntosh CJ, Lun S, Lawrence S, Western AH, McNatty KP, Juengel JL.** The proregion of mouse BMP15 regulates the cooperative interactions of BMP15 and GDF9. *Biol Reprod*, v.79, p.889-896, 2008.
- McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP.** Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction*, v.129, p.473-480, 2005.
- McNatty KP, Juengel JL, Wilson T, Galloway SM, Davis GH, Hudson NL, Moeller CL, Cranfield M, Reader KL, Laitinen MP, Groome NP, Sawyer HR, Ritvos O.** Oocyte derived growth factors and ovulation rate in sheep. *Reproduction*, v.61, p.339-351, 2003.
- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M.** Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, v.147, p.35-51, 2010.
- Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, Kano Y, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H.** Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Reprod*, v.74, p.1073-1082, 2006.
- 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.
- Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Crihiu E, Thimonier J, Teyssieri J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen J-M.** Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.98, n.9, p.5104-5109, 2001.
- Nicol L, Faure M-O, McNeilly JR, Fontaine J, Taragnat C, McNeilly AS.** Bone morphogenetic protein-4 interacts with activin and GnRH to modulate gonadotrophin secretion in L β T2 gonadotrophs. *J Endocrinol*, v.196, p.497-507, 2008.
- 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.
- Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, Katagiri T, Koike T, Takaoka K.** Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway. *J Bone Miner Metab*, v.26, p.478-484, 2008.
- Otsuka F.** Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocr J*, v.57, p.3-14, 2010.
- Otsuka F, Moore KR, Shimasaki S.** Biological function and cellular mechanisms 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 regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.8060-8065, 2002.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S.** Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*, v.275, p.39523-39528, 2000.
- Padhy N, Sathya ML, Varma TR.** Antral follicle size in the down regulated cycle and its relation to in vitro fertilization outcome. *J Hum Reprod Sci*, v.2, p.68-71, 2009.
- Paulini F, Melo EO.** The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.354-361, 2011.
- Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Mandon-Pépin B 1, Monniaux D, Monget P, Fabre S.** Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *J Mol Endocrinol*, v.33, p.805-817, 2004.
- Qiao J, Feng HL.** Extra-and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update*, v.17, p.17-33, 2011.
- Reddi AH.** Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev*, v.8, p.11-20, 1997.
- Samad TA, Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong SJ, Campagna JA, Perusini S, Fabrizio DA, Schneyer AL, Lin HY, Brivanlou AH, Attisano L, Woolf CJ.** DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem*, v.280, p.14122-14129, 2005.
- Sánchez F, Adriaenssens T, Romero S, Smitz J.** Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. *Mol Hum Reprod*, v.15, p.539-550, 2009.
- Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW.** *Caenorhabditis elegans* genes



- sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor- β pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.93, p.790-794, 1996.
- Schwartz NB.** Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. In: Conn PM, Freeman ME Ed.). *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Totowa, NJ: Humana, 2000, p.135-146
- Scully K, Rosenfeld M.** Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*, v.295, p.2231-2235, 2002.
- Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM.** Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.139, p.1347-1358, 1995.
- Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Akiyama I, Harada M, Koga K, Fujimoto A, Yano T, Taketani Y.** Growth differentiation factor 3 is induced by bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) and BMP-7 and increases luteinizing hormone receptor messenger RNA expression in human granulosa cells. *Fertil Steril*, v.97, p.979-983, 2012.
- Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Nose E, Nishii O, Yano T, Taketani Y.** Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and StAR in Human Granulosa Cells. *Am J Reprod Immunol*, v.65, p.421-427, 2011.
- Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Nishii O, Yano T, Taketani Y.** Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) increases the expression of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in human granulosa cells. *Fertil Steril*, v.93, 1273-1279, 2010.
- Shimasaki S, Moore KR, Otsuka F, Erickson GF.** The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, v.25, p.72-101, 2004.
- Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF.** A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.96, p.7282-7287, 1999.
- Shimizu T, Kayamori T, Murayama C, Miyamoto A.** Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 suppress granulosa cell apoptosis via different pathways: BMP-4 via PI3K/PDK-1/Akt and BMP-7 via PI3K/PDK-1/PKC *Biochem Biophys Res Commun*, v.417, p.869-873, 2012.
- Silva JRV, Van den Hurk R, Van Tol HT, Roelen BA, Figueiredo JR.** Expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.11-19, 2004.
- Silva JRV, Van den Hurk R, Van Tol HT, Roelen BA, Figueiredo JR.** The Kit ligand/c-Kit receptor system in goat ovaries: gene expression and protein localization. *Zygote*, v.14, p.317-328, 2006.
- Song K, Krause C, Shi S, Patterson M, Suto R, Grgurevic L, Vukicevic S, Van Dinther M, Falb D, Ten Dijke P, Alaoui-Ismaili M H.** Identification of a Key Residue Mediating Bone Morphogenetic Protein (BMP)-6 Resistance to Noggin Inhibition Allows for Engineered BMPs with Superior Agonist Activity. *J Biol Chem*, v.285, p.12169-12180, 2010.
- 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 YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ.** Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, v.135, p.111-121, 2008.
- Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM, Eppig JJ.** Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol*, v.276, p.64-73, 2004.
- Tanwar PS, McFarlane JR.** Dynamic expression of bone morphogenetic protein 4 in reproductive organs of female mice. *Reproduction*, v.142, p.573-579, 2011.
- Treier M, Gleiberman A S, O'Connell S M, Szeto D P, McMahon J A, McMahon A P, Rosenfeld M G.** Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev*, v.12, p.1691-1704, 1998.
- 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.
- West FD, Roche-Rios MI, Abraham S, Rao RR, Natrajan MS, Bacanamwo M, Stice SL.** KIT ligand and bone morphogenetic protein signaling enhances human embryonic stem cell to germ-like cell differentiation. *Hum Reprod*, v.25, p.168-178, 2010.
- Wieser R, Wrana JL, Massagué J.** GS domain mutations that constitutively activate T R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. *EMBO J*, v.14, p.2199-2208, 1995.
- Wozney JM.** Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res*, v.1, p.267-280, 1989.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J.** Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, v.370, p.341-347, 1994.
- Wu YT, Lu XE, Wang TT, He RH, Xu J, Huang HF.** Women with poor response to ovarian stimulation have increased follicular bone morphogenetic protein-15 levels. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v.36, p.439-



442, 2007a.

Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod*, v.22, p.1526-1531, 2007b.

Xia Y, Yu PB, Sidis Y, Beppu H, Bloch KD, Schneyer AL, Lin HY. Repulsive guidance molecule RGMA alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4. *J Biol Chem*. v.282, p.18129-18140, 2007.

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

Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of BMP8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol*, v.14, p.1053-1063, 2000.

Ying Y, Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol*, v.232, p.484-492, 2001.

Ying Y, Zhao GQ. Detection of multiple bone morphogenetic protein messenger ribonucleic acids and their signal transducer, smad1, during mouse decidualization. *Biol Reprod*, v.63, p.1781-1786, 2000.

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

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

Yoshino O, Shi J, Osuga Y, Harada M, Nishii O, Yano T, Taketani Y. The function of bone morphogenetic proteins in the human ovary. *Reprod Med Biol*, v.10, p.1-7, 2011.
