

VALDEVANE ROCHA ARAÚJO

**INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA-7 (BMP-7)
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIS CAPRINOS**

FORTALEZA-CE

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VALDEVANE ROCHA ARAÚJO

INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA-7 (BMP-7)
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIS CAPRINOS

FORTALEZA-CE

2008

VALDEVANE ROCHA ARAÚJO

**INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA-7 (BMP-7)
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-
ANTRAIS CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de pequenos ruminantes

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

**FORTALEZA-CE
2008**

VALDEVANE ROCHA ARAÚJO

INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA-7 (BMP-7) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 11/ 12/ 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Presidente da banca/ Co-Orientador)
Universidade Estadual do Ceará

Dra. Maria Helena Tavares de Matos
(Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Buratini Júnior
(Examinador)
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho

INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA-7 (BMP-7) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

VALDEVANE ROCHA ARAÚJO

Aprovada em: 11/ 12/ 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Presidente da banca/ Co-Orientador)
Universidade Estadual do Ceará

Dra. Maria Helena Tavares de Matos
(Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Buratini Júnior
(Examinador)
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho

*Aos meus pais do céu, Deus e Nossa Senhora, e aos
meus pais, Valdeci Rocha Araújo e Edite Araújo
Rocha, que sem dúvida, são os responsáveis reais pelo
sucesso da realização deste sonho.*

*Aos meus avós paternos e maternos, em especial a
“painho” que, tão recentemente, papai do céu levou
para perto de si.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Papai e Mamãe do Céu por terem me dado a vida, a saúde e o discernimento em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais: Valdeci Rocha Araújo e Edite Araújo Rocha, pois sem eles nada seria possível. Pelo total apoio e belas palavras nos momentos mais difíceis, não me deixando desistir nunca. Sem dúvida nenhuma, se cheguei até aqui, se mais uma etapa foi vencida, devo tudo a eles. Papai e Mamãe, amor incondicional, amor sem igual, eternamente amor total.

Aos meus irmãos, irmãs, inclusive as que já não estão mais conosco, porque mesmo de longe, sei que estão olhando e orando por todos nós. Aos meus sobrinhos, afilhados e à toda minha família.

Ao Sr. Arnoudo, que tanto torceu e acreditou que um dia eu “chegaria lá”. Na verdade, essa é só mais uma etapa e tenho certeza, que em todas as outras ele estará comigo.

Aos meus amigos, fiéis escudeiros de batalha. Graças a Deus, tenho os mais lindos amigos do mundo. Meus amigos de longas datas, Marcos, Noeme e Edvan.

Aos Professores Maria Marly Forte da Silva Martins, Ricardo Toniolli e Lúcia de Fátima “Lucinha”, meus professores da graduação, que tanto acreditaram e me apoiaram. E que são “responsáveis” por eu estar aqui hoje.

Às muitas pessoas especiais. Se são muitas, quer dizer que tenho muitos amigos e que todos são muito importantes para mim:

À Jamilly Bezerra Bruno, pela mãezona que foi pra mim e agora eu divido com a Sarinha, que é a “coisa” mais gostosa. Por tudo mesmo e mais algumas coisas... tenho certeza de que ela sabe o quanto sou grata;

Aos amigos Deborah de Mello Magalhães “Debys” e Anderson Almeida Pinto, pela ajuda, pelo compaheirismo. Meus lindos amigos, de coração enorme, para todos os momentos;

À Valesca Barreto Luz, Juliana Jales de Hollanda Celestino, Márcia Viviane Alves Saraiva, Roberta Nogueira Chaves, Cleidson Manuel Gomes da Silva, Ana Beatriz Graça Duarte, Sanely Lourenço da Costa Caliman, pelos lindos corações que têm e que tanto me ajudaram, e me apoiaram sempre;

A minha “filhota” linda! Gerlane Modesto da Silva, sem dúvida nenhuma, ela terá um futuro brilhante, não só pela sua capacidade, mas porque Deus tem ótimos planos para ela.

À toda equipe do LAMOFOPA:

Aos técnicos “Leandro”, Patrícia “Paty Girl” e Zandor;

Aos estudantes de iniciação científica Diego, Márcio, Alisson André, Raphael, Rochele, Anelise, Rebeca, Laritza;

Aos pós-graduandos Isabel “Bebel”, Cláudio, Fabrício “Fab”, Rafael “Rafinha”, Janduí “Janduba”, Leonardo, Luciana, Giovanna;

Aos pesquisadores Dra. Maria Helena Tavares de Matos, Prof. Cláudio Cabral Campello e Prof. José Roberto Viana Silva, por todo o apoio e suporte, principalmente pelo conjunto de valores e conhecimentos adquiridos.

Ao Professor José Buratini Júnior, pela presteza em aceitar nosso convite, e pelas várias sugestões relevantes em nosso trabalho.

Aos meus orientadores: eu sempre fiz questão de dizer, que não tinha uma orientadora e dois co-orientadores, mas sim, três orientadores. Sendo assim, agradeço:

Aos Professores Ana Paula Ribeiro Rodrigues, José Ricardo de Figueiredo e Liliam Mara Trevisan Tavares, que souberam me aconselhar e me ajudar em muitos momentos. Mas que, além disso, foram meus apoiadores incondicionais, cada um a seu modo e seu jeito, sempre próximos, e mesmo quando longe, presentes.

À UECE e ao PPGCV:

As secretárias Adriana “Didi”, Cristina “Cris”, Fred, aos servidores “César”, “Sr. André”, que sempre foram tão humanos e se tornaram amigos;

Aos Coordenadores (ex-coordenadores: Profa. Fátima e Profa. Cláudia, e atuais: Prof. Marcos Fábio e Prof. Vicente) e a todos os Professores por todos os conhecimentos adquiridos.

À CAPES, pelo auxílio em forma de bolsa de estudos.

Obrigada, meus pais do céu, por mais uma etapa ultrapassada com sucesso em minha vida.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito de diferentes concentrações da Proteína Morfogénica Óssea-7 (BMP-7) na sobrevivência e no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Fragmentos de tecido cortical ovariano caprino foram cultivados por 1 ou 7 dias em Meio Essencial Mínimo (MEM⁺) suplementado com diferentes concentrações de BMP-7 (0, 1, 10, 50 ou 100 ng/ml). Os fragmentos não cultivados ou aqueles cultivados por 1 ou 7 dias foram processados para histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão (MET), sendo avaliados vários parâmetros como sobrevivência, ativação e crescimento. Os resultados mostraram que após 1 dia de cultivo, apenas a concentração de 1 ng/ml manteve o percentual de folículos morfológicamente normais quando comparado ao controle. Entretanto, no dia 7, todos os tratamentos reduziram significativamente os percentuais de folículos morfológicamente normais quando comparados ao controle não cultivado. Além disso, foi observado um aumento significativo no diâmetro folicular utilizando 10 ng/ml de BMP-7 com a progressão do cultivo do dia 1 para o dia 7. Por outro lado, não houve influência dos tratamentos quando avaliado o diâmetro oocitário. Quando realizada a MET foi observado que os folículos cultivados por até 7 dias na presença de 1 ng/ml de BMP-7 apresentavam ultra-estrutura compatível aos do controle fresco, ou seja, apresentavam-se normais. Desta forma, pode-se concluir que a BMP-7 em baixas concentrações (1 ng/ml) é capaz de manter a sobrevivência durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.

Palavras-Chave: Caprinos, folículos pré-antrais, cultivo, sobrevivência, BMP-7.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the effect of different concentrations of BMP-7 in the *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles. Fragments of caprine ovarian cortical tissue were cultured for 1 or 7 days in Minimum Essential Medium (MEM⁺) supplemented with different concentrations of BMP-7 (0, 1, 10, 50 or 100 ng/ml). Non-cultured fragments or those cultured for 1 or 7 days were processed for classical histology and transmission electron microscopy (TEM). Parameters such as follicular survival, activation and growth were evaluated. After 1 or 7 days of culture, the percentage of morphologically normal follicles significantly reduced in all treatments when compared with fresh control, except at 1 ng/ml of BMP-7 for 1 day. In addition, the concentration of 10 ng/ml of BMP-7 significantly increased follicular diameter from day 1 to 7 of culture. There was not any influence of the other concentrations of BMP-7 regarding to the follicular and oocyte diameter. Ultrastructure studies confirmed follicular integrity after 7 days of culture in 1 ng/ml BMP-7. In conclusion, small concentrations of BMP-7 can improve the survival of caprine preantral follicles during *in vitro* culture.

Keywords: Caprine, preantral follicles, culture, survival, BMP-7.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura cristalizada da Proteína Morfogenética do Osso 6 em dois ângulos diferentes [mmdbId:60210 e mmdbId:60211] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 26
- Figure 1. Histological section of non-cultured tissue after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin, showing normal follicles. O = oocyte, NU = oocyte nucleus, GC = granulosa cells (400x). 57
- Figura 2. Estrutura cristalizada da Proteína Morfogenética Óssea-7 em dois ângulos diferentes [mmdbId:22322 e mmdbId:22323] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 26
- Figure 2. Percentages (means \pm SEM) of histologically normal preantral follicles in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM⁺ and MEM⁺ supplemented with 1, 10, 50 and 100ng/ml BMP-7. 58
- Figura 3. Ligantes, receptores, sinalização e transcrição de BMPs e TGF β . 28
- Figure 3. Electron micrograph of a preantral follicle from (A) a non-cultured control (7800x) and (B) cultured in BMP-7 (1ng/ml) for 7 days (1800x). Note the homogeneous cytoplasm with numerous rounded mitochondria. NU = oocyte nucleus, GC = granulosa cells, m = mitochondria, ser = smooth endoplasmic reticulum, v = vesicle. 59

LISTA DE TABELAS

Table 1. Percentages (mean \pm SEM) of primordial and growing follicles (primary and secondary) in non-cultured tissues and in tissues cultured for 1 or 7 days in MEM⁺ (control medium) and MEM⁺ supplemented with various concentrations of BMP-7. 54

Table 2. Follicle and oocyte diameters (mean \pm S.E.M.) in non-cultured tissues and in tissues cultured for 1 or 7days in MEM⁺ (control medium) and MEM⁺ supplemented with various concentrations of BMP-7. 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------|---|
| ANOVA | : Análise de Variância |
| ATP | : Adenosina Tri-Fosfato |
| BMP | : Proteína Morfogenética Óssea |
| BMP-2 | : Proteína Morfogenética Óssea-2 |
| BMP-4 | : Proteína Morfogenética Óssea-4 |
| BMP-6 | : Proteína Morfogenética Óssea-6 |
| BMP-7 | : Proteína Morfogenética Óssea-7 |
| BMP-15 | : Proteína Morfogenética Óssea-15 |
| °C | : Graus Celsius |
| CCO | : Complexo <i>Cumulus</i> Oócito |
| CG | : Células da Granulosa |
| CGP | : Células Germinativas Primordiais |
| CNPq | : Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CT | : Células da Teca |
| DNA | : Ácido Desoxirribonucléico |
| EGF | : Fator de Crescimento Epidermal |
| Fig. | : Figura |
| FGFb | : Fator de Crescimento Fibroblástico básico |
| FOPA | : Folículos Ovarianos Pré-Antrais |
| FSH | : Hormônio Folículo Estimulante |
| h | : Horas |
| HC | : Histologia Clássica |
| IBGE | : Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IGF-1 | : Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 |
| KL | : <i>Kit Ligand</i> |
| LAMOFOPA | : Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais |
| LIF | : Fator Inibitório de Leucemia |
| LH | : Hormônio Luteinizante |
| MEM | : Meio Essencial Mínimo |
| MET | : Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| min. | : Minuto |
| mL | : Mililitro |

| | |
|--------------|--|
| mm | : Milímetro |
| MOIFOPA | : Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais |
| n | : Número |
| ng | : Nanograma |
| PAS | : Ácido periódico de Schiff |
| P<0,05 | : Probabilidade de erro menor do que 5% |
| PPGCV | : Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias |
| SRD | : Sem Raça Definida |
| TGF- β | : Fator de Crescimento Transformante- β |
| UECE | : Universidade Estadual do Ceará |
| UnB | : Universidade de Brasília |
| ZP | : Zona Pelúcida |
| μ L | : Microlitro |
| μ m | : Micrômetro |
| % | : Percentagem |
| 400x | : Aumento de 400 vezes |
| 1800x | : Aumento de 1800 vezes |
| 7800x | : Aumento de 7800 vezes |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| LISTA DE FIGURAS | 12 |
| LISTA DE TABELAS | 13 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | 14 |
| SUMÁRIO | 16 |
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA (CAPÍTULO 1 - PAPEL DAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS-6 E -7 (BMP-6 E -7) NA REGULAÇÃO DA FOLICULOGÊNESE INICIAL EM MAMÍFEROS)..... | 19 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 38 |
| 4 HIPÓTESE CIENTÍFICA | 39 |
| 5 OBJETIVOS | 39 |
| 5.1 Geral | 39 |
| 5.2 Específicos | 39 |
| 6 CAPÍTULO 2 (EFFECT OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-7 (BMP-7) ON IN VITRO SURVIVAL OF CAPRINE PREANTRAL FOLLICLES)..... | 40 |
| 7 CONCLUSÃO GERAL | 60 |
| 8 PERSPECTIVAS GERAIS | 60 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, existem mais de 7 milhões de caprinos, dos quais, cerca de 90,76% destes animais estão concentrados na região Nordeste. Considerando a dimensão territorial do país, bem como as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da caprinocultura no Nordeste, nas últimas décadas, várias pesquisas com ênfase nas biotécnicas de reprodução assistida, têm sido realizadas visando aumentar o potencial reprodutivo e a produtividade dos rebanhos (IBGE, 2006). Dentre estas técnicas, pode-se destacar a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA).

A biotécnica de MOIFOPA tem como objetivo principal a recuperação de folículos pré-antrais (FOPA) do ovário para o cultivo *in vitro* até a completa maturação oocitária, prevenindo-os, portanto, do processo de morte celular, denominado de atresia, processo que ocorre naturalmente *in vivo*. No entanto, para que isso seja possível, é necessária uma melhor compreensão acerca da fisiologia ovariana para a elucidação dos mecanismos e fatores envolvidos na foliculogênese na fase inicial de desenvolvimento, ou seja, fase pré-antral (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A regulação da foliculogênese é um processo complexo e contínuo, controlado por uma variedade de fatores, sejam eles extra-ovarianos, isto é, gonadotrofinas, ou aqueles produzidos localmente no ovário. Durante a foliculogênese, ocorre o crescimento do oócito além de uma intensa proliferação de células da granulosa (GOUGEON, 1996). No entanto, estudos relacionados aos estádios iniciais da foliculogênese, especialmente o início do crescimento folicular, ainda permanecem obscuros (CHAVES *et al.*, 2008). Neste sentido, vários pesquisadores têm testado diferentes substâncias, como hormônios (FSH – MATOS *et al.*, 2007; CALONGOS *et al.*, 2008 e LH – FLAWS *et al.*, 1997; SARAIVA *et al.*, 2008) e fatores de crescimento (EGF – SILVA *et al.*, 2004 e FGFb – MATOS *et al.*, 2007) com a finalidade de definir um sistema de cultivo que garanta a manutenção da sobrevivência, bem como, o crescimento folicular *in vitro*.

No tocante à utilização de alguns fatores de crescimento, pose-se destacar as Proteínas Morfogenéticas Ósseas-BMP. Estas proteínas pertencem à superfamília do Fator de Crescimento Transformante- β -TGF- β , representando uma subfamília específica. Até o momento, foram descritas 20 BMPs sendo apenas sete dessas (BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 e -15) localizadas em ovários mamíferos (MASSAGUE e WOTTON, 2000). Estas proteínas são sinalizadas por moléculas extracelulares e estão envolvidas em múltiplos papéis na regulação

do crescimento, diferenciação e apoptose de numerosos tipos celulares, além de exercerem funções na foliculogênese e ovulação (GLISTER *et al.*, 2004).

A expressão de RNAm para BMP-7 foi detectada 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) e seu receptor (BMPR-II) localizados em células da granulosa (SHIMASAKI *et al.*, 1999). Em camundongas, LEE *et al.* (2001) demonstraram que a BMP-7 está envolvida na multiplicação das células da granulosa e na transição *in vitro* de folículos do estágio de primordial para primário (LEE *et al.* 2004).

Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados às bases gerais da oogênese e foliculogênese, ativação de folículos primordiais e crescimento de folículos pré-antrais, população folicular ovariana, atresia, bem como estudos da foliculogênese *in vitro* e ainda, a influência das BMPs na regulação da foliculogênese inicial.

2 REVISÃO DE LITERATURA (CAPÍTULO 1)

PAPEL DAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS-6 E -7 (BMP-6 E -7) NA REGULAÇÃO DA FOLICULOGÊNESE INICIAL EM MAMÍFEROS

Valdevane Rocha ARAÚJO, Anderson Pinto ALMEIDA, Deborah de Mello MAGALHÃES,
Maria Helena Tavares de MATOS; Liliam Mara Trevisan TAVARES, José Ricardo de
FIGUEIREDO, Ana Paula Ribeiro RODRIGUES

(artigo submetido na *Revista Brasileira de Reprodução Animal*)

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) on the regulation of early folliculogenesis in mammals*)

Valdevane Rocha ARAÚJO^{a*}, Anderson Pinto ALMEIDA^a, Deborah de Melo MAGALHÃES^a, Maria Helena Tavares de MATOS^a, Liliam Mara Trevisan TAVARES^a, José Ricardo de FIGUEIREDO^a, Ana Paula Ribeiro RODRIGUES^a

^aLaboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais
LAMOFOPA - Universidade Estadual do Ceará (UECE), 60740-000, Fortaleza, Ceará
*Correspondência, 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 denominado foliculogênese. Dentre estes fatores, destacam-se as BMPs, as quais agem de maneira autócrina e/ou parácrina modulando a função ovariana. Esta revisão aborda a influência das BMPs, mais especificamente as BMP-6 e -7, na foliculogênese inicial em mamíferos.

Palavras-chave: Proteínas Morfogenéticas Ósseas, Foliculogênese, Oócito, Células da granulosa.

Abstract

Studies concerning the relationship between the oocyte and its surrounding somatic cells are very important for the understanding of factors regulating the complex process called folliculogenesis. Among these factors, it is important to mention the BMPs, which act in autocrine and/or paracrine manner modulating the ovarian functions. This review is focus on the influence of BMPs, more specifically, BMP-6 and -7, on early folliculogenesis in mammals.

Keywords: Bone Morphogenetic Proteins, Folliculogenesis, Oocyte, Granulosa cell.

Introdução

Uma maior compreensão das diferentes substâncias envolvidas no desenvolvimento folicular e no curso da atresia, é importante para subsidiar a elaboração de um sistema de cultivo eficiente que permita a ativação folicular *in vitro*, assegurando assim o posterior desenvolvimento de um grande número de folículos 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 do Fator de Crescimento Transformante- β (TGF- β). Dentro desta superfamília, as BMPs compreendem o maior subgrupo de ligantes, sendo descritos 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). Além disso, tem sido hipotetizado que no interior dos folículos antrais, os oócitos continuam a influenciar o comportamento das células da granulosa (CG) que o circundam, via produção de fatores específicos secretados pelos oócitos, assim regulando seu próprio micro-ambiente (Eppig, 2001, Gilchrist *et al.*, 2004). A BMP-15 e o Fator de Crescimento de Diferenciação-9 (GDF-9) exclusivamente produzidos pelo oócito, juntamente com a BMP-6, são os principais candidatos para este papel.

A expressão de receptores de BMP nos oócitos (Souza *et al.* 2002, Erickson e Shimasaki 2003, Glister *et al.* 2004) sugere um papel destas na modulação do desenvolvimento bem como na maturação oocitária. No entanto, recentes estudos (Fatehi *et al.*, 2005) demonstraram que o cultivo de complexo *cumulus* oócito (CCO) bovino na presença de BMP-2 e -4 exógenos não influenciou a maturação nuclear do oócito, expansão das células do *cumulus* e posterior formação de blastocisto.

Tendo em vista a importância das BMPs na reprodução de mamíferos, a presente revisão tem como objetivo abordar o papel intra-ovariano, especificamente das BMP-6 e -7, na foliculogênese mamífera inicial ou pré-antral.

Bases gerais da oogênese e foliculogênese

Em mamíferos, os estádios iniciais do desenvolvimento ovariano, ainda no período pré-natal, são desencadeados pela migração das células germinativas primordiais (CGP) do saco vitelino embrionário para a gônada primitiva e sua posterior colonização (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Com a finalidade de verificar quais fatores de crescimento e/ou hormônios estão envolvidos no controle do desenvolvimento de CGP, diversos estudos têm sugerido um papel importante de algumas substâncias. Dentre elas, podem ser destacadas as BMPs. A ausência de tais substâncias, em embriões de camundongos, promove a falha no desenvolvimento das CGP (BMP-4: Lawson *et al.*, 1999, BMP-8: Ying *et al.*, 2000). Essa afirmação sugere fortemente que as BMPs podem estar envolvidas na formação e 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 CGP em oogônias meioticamente ativas, marcadas pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno, preparando a célula para divisão meiótica. Posteriormente, estas oogônias se tornam então 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. Ao chegar neste estágio da meiose, o oócito fica rodeado por uma única camada de 4-8 células da pré-granulosa, constituindo neste momento efetivamente a primeira categoria dos folículos pré-antrais (FOPAs), ou seja, os folículos primordiais (Fair, 2003), dando início ao processo de foliculogênese. Tais 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, 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 apresentada com maiores detalhes.

O processo de folículo-gênese ocorre no córtex ovariano e tem seu sucesso a partir de altos níveis de organização e citodiferenciação (Erickson e Williams, 2008). Em alguns folículos, estão presentes tanto células pavimentosas quanto cúbicas, dando origem à classe dos folículos de transição (Van den Hurk *et al.*, 1997). Com a evolução folicular e após o recrutamento, os FOPAs mamíferos iniciam uma série de mudanças morfofisiológicas que envolvem o crescimento e diferenciação do oócito, bem como, a proliferação e diferenciação das CG e o desenvolvimento das células da teca (CT) (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 central tornam-se cubóides, 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 CG sofrem proliferação, diferenciam-se e há um aumento do oócito em tamanho e conteúdo protéico (Picton *et al.*, 1998) bem como 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, a zona pelúcida (ZP), uma camada composta por glicoproteínas (ZP-1, -2 e -3), começa a ser formada circundando o oócito mamífero (Rankin *et al.*, 2001). No entanto, Gook *et al.* (2008), verificaram a presença das proteínas para ZP em folículos desde os estádios de primordial, na espécie humana sugerindo que estas proteínas estão presentes desde o início da folículo-gênese.

Os folículos alcançam o estágio secundário quando duas ou mais camadas de CG cubóides estão circundando o oócito e as CT já estão formadas e se evidenciam do 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). Além disso, a proliferação das CG e CT será, em parte, responsável pelo posterior desenvolvimento do folículo antral (Skinner, 2005).

Ativação de folículos primordiais e Crescimento de folículos pré-antrais

A ativação do folículo primordial é caracterizada pela transformação das CG que circundam o oócito, de sua forma pavimentosa para a forma cuboidal e conseqüente proliferação (Fair *et al.*, 1997; Braw-Tal e Yossefi, 1997), seguida do aumento do diâmetro oocitário. Para entender a ativação ou o início do crescimento de folículos primordiais, torna-se necessário o conhecimento sobre 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 (CG 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 ATP, pois os FOPAs parecem ser capazes de gerar energia suficiente em condições anaeróbias. No entanto, para o crescimento normal, maturação e 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 CG são considerados semelhantes àqueles que promovem a ativação do folículo primordial. Dentre estes fatores destacam-se o Kit Ligand (KL – Parrot e Skinner, 1999), Fator de Crescimento Fibroblástico básico (FGFb – Nilsson *et al.*, 2001) e Fator Inibitório de Leucemia (LIF – Nilsson *et al.*, 2002) e a BMP-7 (Lee *et al.*, 2001). O cultivo *in vitro* de CG 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 conseqüente 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 CG (Lee *et al.*, 2001) ou ainda pela sua associação com o FSH (Lee *et al.*, 2004) uma vez que quando utilizados em combinação, também promoveram ativação de folículos primordiais.

Durante a fase de crescimento dos folículos primordiais, 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 que serão posteriormente maturados. A abundância de mitocôndrias alongadas e em divisão, e ainda dos retículos endoplasmáticos liso e rugoso refletem o aumento da síntese de energia 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 em falhas no desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto (Fair e Hyttel, 1997).

População folicular ovariana

Os FOPAs representam 90% da população folicular e constituem o estoque de gametas femininos (Liu *et al.*, 2001). Independente disso, numericamente a população folicular difere entre as espécies, além de ser observada uma forte variação individual (Katska-Ksiazkiewicz, 2006), sendo de aproximadamente 1.500 em camundongas (Shaw *et al.*, 2000); 35.000 em cabras (Lucci *et al.*, 1999); 33.000 em ovelhas (Amorim *et al.*, 2000); 235.000 em vacas (Betteridge *et al.*, 1989) e 2.000.000 nas mulheres (Erickson, 1986). Apesar da grande população folicular presente no ovário mamífero, a maioria dos folículos, 99,9%, não chega à ovulação, pois são eliminados por um processo natural, denominado atresia ou morte folicular (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).

Atresia

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 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).

Sabe-se que a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular na via degenerativa (Farber, 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüente degeneração (Barros *et al.*, 2001). Estudos realizados em ovários caprinos mostraram por análise histológica e ultra-estrutural que em folículos primordiais e primários degenerados, o oócito é mais sensível do que as CG, apresentando-se retraído e com núcleo picnótico, além de numerosos vacúolos no ooplasma (degeneração tipo 1 – alterações apenas no oócito). Já em folículos secundários, as alterações foram observadas em ambos os compartimentos foliculares, caracterizando, portanto a degeneração do tipo 2 (Silva *et al.*, 2002). Esse tipo de degeneração, no entanto, é mais freqüente em folículos

antrais. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas CG (Silva *et al.*, 2002).

A apoptose, ou morte celular programada, é um programa de suicídio celular ativo encontrado em todos os organismos multicelulares e ocorre em tecidos que estão sofrendo alterações de desenvolvimento ou respondendo a um estímulo fisiológico. A alteração típica observada é a condensação da cromatina, resultando na formação de zonas densas de heterocromatina sobre a membrana nuclear. Independentemente da condensação da cromatina, endonucleases dependentes de cálcio e magnésio são ativadas, resultando na clivagem do DNA entre as unidades nucleossomais, a cada 180-200 pares de bases (Tilly, 1996) e formação dos corpos apoptóticos. Muitas características morfológicas da apoptose têm sido demonstradas em oócitos e CG. 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).

A atresia, seja por meio da degeneração ou da apoptose, conforme anteriormente descrita, é um processo regulado principalmente por fatores endócrinos, como os hormônios FSH e LH, fatores parácrinos, incluindo o KL, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1), EGF, FGFb, ativina e as BMPs. Desta forma, é provável, que o balanço entre os fatores que promovem sobrevivência e aqueles que induzem a morte decidirá se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (Hsu e Hsueh, 2000).

Diante disso, visando evitar a enorme 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 mecanismos envolvidos no crescimento e na atresia folicular.

Estudo da foliculogênese *in vitro*

Apesar de muito já ser conhecido acerca da foliculogênese antral, pouco se sabe sobre a fase pré-antral, sobretudo com relação aos fatores e mecanismos responsáveis pelo 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 FOPAs 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).

O estudo da foliculogênese *in vitro* pode ser realizado através de diferentes sistemas, como por exemplo, o cultivo do folículo presente em pequenos fragmentos de ovário (*in situ*), ou o cultivo do folículo isolado do córtex ovariano. O sistema de cultivo *in vitro* que utiliza fragmentos ovarianos, apresenta como principais vantagens, a manutenção da estrutura folicular e uma maior praticidade (Telfer, 1996). Por outro lado, o cultivo de folículos isolados permite uma maior perfusão do meio, bem como a possibilidade de cultivar individualmente folículos pré-antrais em diferentes categorias (primordial, primário, secundário).

Nos últimos anos, tem sido observado um considerável progresso no tocante ao crescimento e maturação *in vitro* de FOPAs em diferentes espécies animais. Em humanos (Roy e Treacy, 1993), caprinos (Huamin e Yong, 2000), bovinos (Itoh *et al.*, 2002), ovinos (Arunakumari *et al.*, 2007), grandes folículos secundários isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até o estágio antral. Apesar desses avanços, os resultados mais satisfatórios observados em ruminantes até o presente momento foram relatados recentemente por Gupta *et*

al. (2008), em que oócitos oriundos de folículos secundários de búfalas 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 sendo caracterizados 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. 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 folicular e maturação oocitária *in vitro*. Nesse sentido, diferentes fatores e substâncias têm sido amplamente estudados e empregados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais visando conhecer a ação sobre a foliculogênese na sua fase inicial. Dentre as substâncias, podem ser citadas as BMPs, as quais tem sido demonstradas ter um importante papel no desenvolvimento folicular.

Influência das BMPs na regulação da foliculogênese inicial

A capacidade das células somáticas em controlar e manter o processo de gametogênese é um requisito essencial para a reprodução em mamíferos (Skinner, 2005). A regulação do crescimento, a partir da proliferação celular e citodiferenciação de folículos 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 folículos 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, membros da superfamília TGF- β . Das 20 BMPs descritas até o momento (Massague e Wotton, 2000), apenas sete dessas (BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 e -15) foram localizadas em ovários mamíferos (Hogan, 1996; Wozney e Rosen, 1998; Dube *et al.*, 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, diferenciação e apoptose de vários tipos celulares, além de exercerem funções na foliculogênese e ovulação (Glister *et al.*, 2004).

Caracterização estrutural das BMPs

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 crítica para sua atividade biológica (Wang *et al.*, 1990; Israel *et al.*, 1992; 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 (Aono *et al.*, 1995; Israel *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997; Kusumoto *et al.*, 1997).

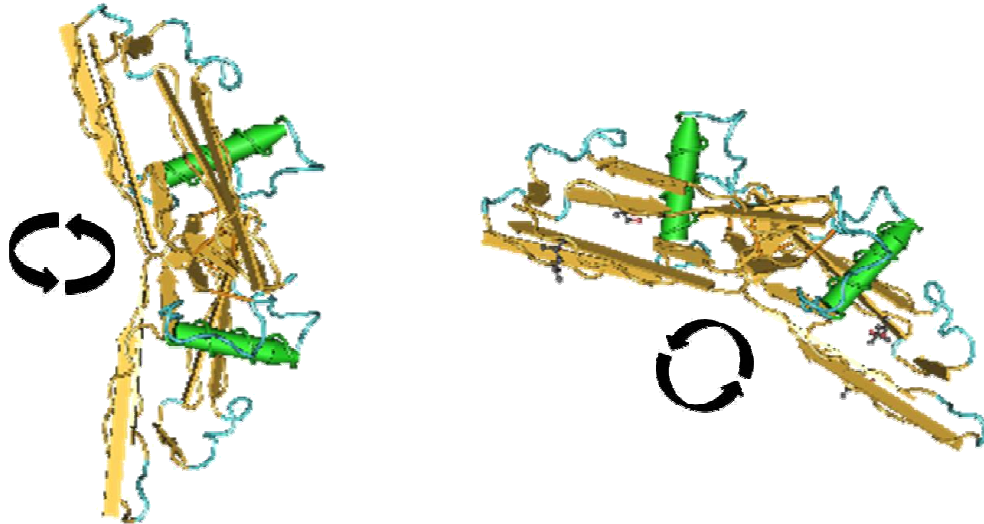


Figura 1. Estrutura cristalizada da Proteína Morfogenética Óssea-6 em dois ângulos diferentes [mmdbId:60210 e mmdbId:60211] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

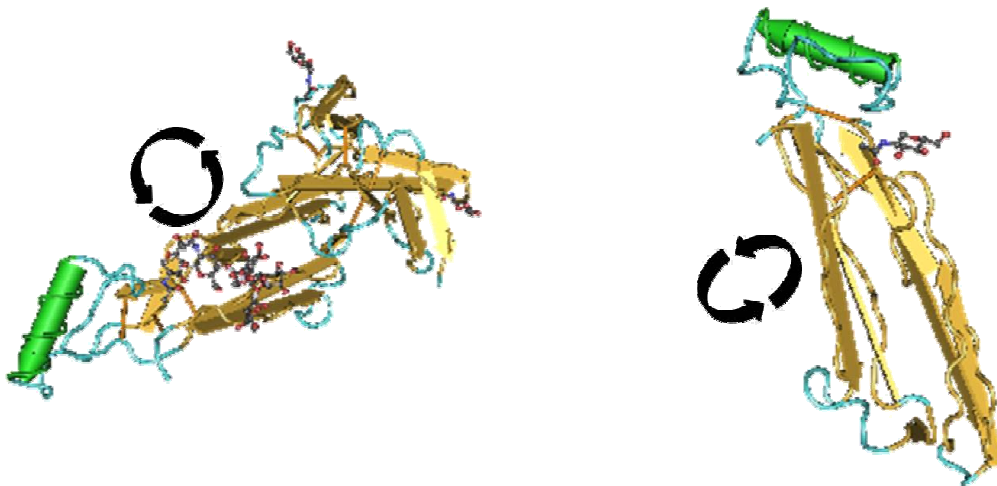


Figura 2. Estrutura cristalizada da Proteína Morfogenética Óssea-7 em dois ângulos diferentes [mmdbId:22322 e mmdbId:22323] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

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/Alk3, BMPR-IB/Alk6 e 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 BMP-6 e -7 no tecido ovariano

Diversos fatores de crescimento, incluindo os membros da superfamília TGF- β , são expressos em oócitos, CG e CT, de acordo com o estágio de desenvolvimento do folículo,

funcionando como moléculas reguladoras intra-ovarianas envolvidas no recrutamento folicular, proliferação/atresia de CG e CT, esteroidogênese, maturação oocitária, ovulação e luteinização (Knight e Glister, 2003).

Vários genes de BMPs são expressos no ovário de mamíferos. O RNAm que codifica a BMP-6, por exemplo, já foi identificado em ovários de murinos (Lyons et al, 1989; Otsuka et al., 2000; Erickson e Shimasaki, 2003), mulheres (Hino et al., 1996), e porcas recém-nascidas (Shimizu et al., 2004). Já o RNAm para BMP-7, teve sua presença identificada através de estudos utilizando a técnica de hibridização *in situ* em CT de folículos pré-ovulatórios de ratas normais cíclicas (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.

A BMP-6 é uma proteína expressa no oócito (ovelha: Juengel et al., 2006; rata: Otsuka et al., 2001; vaca: Glister et al., 2004; porca: Brankin et al., 2005; camundongas Elvin et al. 2000), CG (rata: Erickson e Shimasaki, 2003; vaca: Glister et al., 2004 e porca: Brankin et al., 2005) e CT (ovelha: Campbell et al., 2004; vaca: Glister et al., 2004) de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento. Além disso, foi observada na espécie suína a expressão desta proteína no líquido folicular (Quinn et al., 2004). Entretanto, a expressão da proteína para BMP-7 foi identificada apenas em CT de folículos pré-ovulatórios de ratas (Shimasaki et al., 1999).

A expressão dos receptores de BMP já foi observada nos diferentes compartimentos foliculares, ou seja, nas CG, CT e nos oócitos. O RNAm para BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II é expresso em oócitos e CG de ratas (Shimasaki et al., 1999) e porcas (Quinn et al., 2004), sendo nesta última espécie, observada a expressão também nas CT. Em ovelhas, os receptores de BMP estão localizados nos oócitos, CG (tanto de folículos primários, quanto antrais), CT (folículos antrais) e na superfície do epitélio ovariano (Wilson et al., 2001; Souza et al., 2002). O RNAm para BMPR-II foi detectado em CG e oócitos de folículos antrais em ratas (Shimasaki et al., 1999; Erickson e Shimasaki, 2003). Em vacas, o RNAm do BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-IA, ActR-IIB e BMPR-II foi observado 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). Estudos realizados em ratas demonstraram que os receptores da BMP-7 (BMPR-II) estão expressos nas CG de folículos a partir do estágio secundário (Shimasaki et al., 1999). Além disso, o RNAm para os receptores da BMP-6 (BMPR-IA, -IB e II) são expressos nos oócitos e nas CG de folículos caprinos (Silva et al., 2004) e de várias outras espécies mamíferas como 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. Para uma ligação eficiente e posterior transdução do sinal, os receptores de BMP exigem a formação de um complexo heterodimérico entre os dois tipos de receptores (Liu et al., 1995; Findlay et al., 2002). Uma vez que o complexo ligante-receptor é formado, o receptor do tipo II fosforila e ativa receptores do tipo I que desencadeiam a seqüência de eventos da via de sinalização das BMPs (Massague, 1998; Miyazono et al., 2001) a qual, por sua vez, ativa reguladores transcricionais chamados *Smads*, que convertem o sinal para o núcleo modificando a expressão gênica (Fig. 3). A via *Smad* é regulada pelo mediador *Smad 4* e inibidores *Smad* (*Smad 6* e *7*) (Ishidou et al., 1995; ten Dijke e Hill, 2004; Termaat et al., 2005). O complexo de proteínas *Smad* são efetores nucleares e determinam a sinalização através da ativação ou

repressão dos genes alvo no núcleo e que alteram a atividade celular, incluindo o crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular (Itoh *et al.*, 2000; Kawabata *et al.*, 1999; von Bubnoff e Cho, 2001). As BMPs ativam as vias *Smad*-1, -5 e -8, enquanto que a ativina e TGF- β ativam as vias *Smad*-2 e -3 (Miyazono *et al.* 2000, Miyazawa *et al.* 2002).

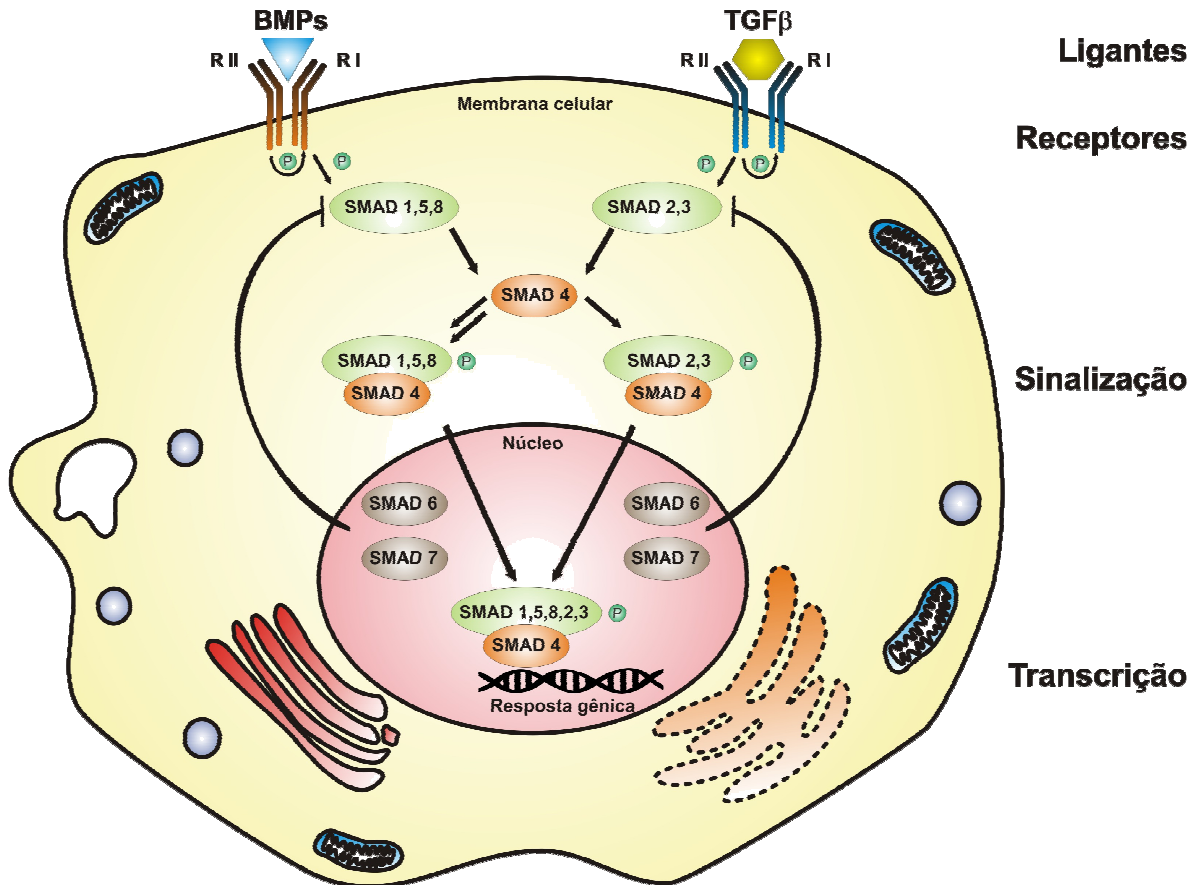


Figura 3. Ligantes, receptores, sinalização e transcrição de BMPs e TGF β . As BMPs são ligantes diméricos (com nó de cisteína em cada monômero) que interagem tanto com receptores tipo I (RI), quanto receptores tipo II (RII). Na cascata de sinalização, o receptor do tipo II fosforila o receptor do tipo I. A associação entre os receptores I e II resulta no complexo sinal-transdução. O complexo quinase BMP e receptor tipo 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 receptor tipo 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* fosforilados 1, 5 ou 8 interagem com o *Smad* 4 e penetram no núcleo para ativar a maquinaria transcriptacional para 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 camundongos transgênicos *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 tamanho da ninhada, sugerindo que esta proteína pode não ser essencial para a fertilidade de murinos (Solloway *et al.*, 1998).

A multiplicação das CG é um dos eventos associados com o crescimento de folículos primordiais. 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 CG (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 CG quando cultivadas *in vitro* por seis dias em meio adicionado de BMP-6. Além disso, demonstrou-se que esta proteína é importante na proliferação de CG e CT em ovinos (Juengel *et al.*, 2006) e suínos (Brankin *et al.*, 2005). 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 papel no controle do crescimento oocitário, bem como na multiplicação das CG. Estudos *in vitro*, com as BMP-4 (Nilsson e Skinner, 2003) e BMP-7 (Lee *et al.*, 2004) mostraram que estas proteínas promovem a manutenção da viabilidade, bem como a ativação e o crescimento de folículos primordiais de ratas e camundongas, respectivamente. Além disso, a utilização da BMP-7 aumentou a proliferação de CG cultivadas *in vitro*, em vacas (Glister *et al.*, 2004) e ratas (Lee *et al.*, 2001). Otsuka e Shimasaki (2002), observaram que as BMP-7 e -15 estimularam a síntese de DNA pelas CG de folículos primários cultivados *in vitro* e ainda, apenas a BMP-7 manteve esse estímulo quando as CG foram cultivadas juntamente com os oócitos. Por outro lado, quando CG 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 (ovelhas: Juengel *et al.*, 2006). Adicionalmente, múltiplos fatores, incluindo o estágio de maturação ou número de CG 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 secreção de peptídeos

As BMP-4, -6 e -7, estimularam a produção de estradiol, inibina-A, ativina-A e folistatina (Lee *et al.*, 2001) inibindo (ratas: Shimasaki *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Otsuka *et al.*, 2001; ovelhas: Juengel *et al.*, 2006; vacas: Glister *et al.* 2004) ou não afetando (McNatty *et al.*, 2001) a secreção de progesterona pelas CG. Por outro lado, a interação de BMP-6 e FSH, não modificou a secreção de estradiol pelas CG (ratas: Miyoshi *et al.*, 2007). A afinidade da folistatina com cada BMP é um potencial modulador da ação das BMPs no ovário mamífero (Glister *et al.*, 2004). A expressão e secreção das subunidades da inibina tem sido demonstradas como potencialmente influenciadoras do sistema BMP em CG-luteínicas (mulheres: Jaatinen *et al.*, 2002). Além disso, 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 responsividade das BMPs ao FSH foi associada ao aumento do número ou 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 deste hormônio (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 foram detectados em células hipofisárias de camundongas, indicam que além das BMP-6 e -7 funcionarem como estimuladores de FSH, podem manter os níveis basais deste hormônio *in vivo* após utilização de anti-BMP-7 (Huang *et al.*, 2001).

Considerações e perspectivas finais

Conforme mostrado nesta revisão, evidenciou-se a participação das BMP -6 e -7, na modulação do desenvolvimento folicular e função ovariana. Estas proteínas tem sido caracterizadas como importantes fatores que associadas a outros produzidos sistêmica ou localmente, podem atuar na manutenção da atividade ovariana, de forma a influenciar a esteroidogênese e atrasar o início da atresia e/ou luteinização. Uma melhor compreensão acerca dos papéis de tais proteínas no ovário poderá contribuir para a elucidação da foliculogênese ovariana bem como, para o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* capazes de promover o crescimento e a maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais.

Referências

- Amorim CA, Lucci CM, Rodrigues APR, Carvalho FCA, Figueiredo JR, Rondina D, Cecchi R, Giorgetti A, Artini A, Gonçalves PBD.** Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *Theriogenology* v.53, p.1251-1262, 2000.
- Aono A, Hazama M, Notoya K, Taketomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, Sasaki S, Fujisawa Y.** Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* v.210, p.670-677, 1995.
- 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 Ruminant Research* 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.
- Barros LF, Hermosilla T, Castro J.** Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.130, p.401-409, 2001.
- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA** Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* v.38, p.87-98, 1989.
- Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG.** Characterization of follicular energy metabolism. *Human Reproduction* v. 9, p.604-609, 1994.
- Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG.** Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary. *Domest Anim Endocrinol* v.28, p.367-379, 2005.
- Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG.** BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology* v.29, p.593-604, 2005.
- 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, 165-171, 1997.
- Bristol-Gould, S., Woodruff, T.K.** 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 morphogenic proteins (BMP). *Biology of Reproduction*; Special Issue: 37th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction Vancouver, Canada:270. 2004.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-b 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-beta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 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.** An analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars in reproductive endocrinology* v.4, p.233-254, 1986.
- Erickson GF, Shimasaki S.** The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenic 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, Hyttel P.** Oocyte growth in cattle-ultrastructure, transcription and developmental competence. In: MOTTA P.M. (Ed.), *Microscopy of Reproduction and Development: A Dynamic Approach*. Antonio Delfino, Rome, p.109-118, 1997.
- 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.** Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* v.78, p.203-216, 2003.
- Farber JL.** Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab Invest* v.47, p.114-123, 1982.
- 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, Nussgens 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, P. B. D.; FIGUEIREDO, J.

- R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Editora Roca, p.303-327, 2008.
- Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF.** Recruitment and development of the follicle the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol* v.191, p.35-43, 2002.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT.** Oocyte-somatic cell interaction during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* v. 82-83, p.431-446, 2004.
- Glister C, Knight PG.** Immunocytochemical evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) signaling system in bovine antral follicles. *Reproduction Abstract Series* v.29, p.5 (abstract 4), 2002.
- 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.
- Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M.** Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Human Reproduction*, 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* 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.
- Hino J, Takao M, Takeshita N, Konno Y, Nishizawa T, Matsuo H.** cDNA cloning and genomic structure of human bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b). *Biochem Biophys Res Commun* v.223, p.304-310, 1996.
- 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 and Development* v.10, p.1580-1594, 1996.
- Hsu SY, Hsueh AJ** Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm *Physiological Reviews* 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*. Academic Press, New York, p. 247-273, 1962.
- Ireland JJ.** Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility* v.34 (suppl), p.39-54, 1987.
- Ishidou Y, Kitajima I, Obama H, Maruyama I, Murata F, Imamura T, Yamada N, Ten Dijke P, Miyazono K, Sakou T.** Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res* v.10, p.1651-2659, 1995.
- Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ.** Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors*, v.7, p.139-150, 1992.
- 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 S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P.** Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* v.267, p.6954-6967, 2000.

- 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. *Biology of Reproduction* v.67, p.1099-1105, 2002.
- Jaatinen R, Bondestam J, Raivio T, Hilden K, Dunkel L, Groome N, Ritvos O.** Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin bB-subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* v.87, p.1254-1261, 2002.
- 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.
- Katska-Ksiazkiewicz L.** Recent achievements in *in vitro* culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reproductive Biology*, v.6, p.3-16, 2006.
- Kawabata M, Imamura T, Inoue H, Hanai J, Nishihara A, Hanyu A, Takase M, Ishidou Y, Udagawa Y, Oeda E, Goto D, Yagi K, Kato M, Miyazono K.** Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins. *Ann NY Acad Sci* v.886, p.73-82, 1999.
- 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.
- Kusumoto K, Bessho K, Fujimura K, Akioka J, Ogawa Y, Iizuka T.** Comparison of ectopic osteoinduction in vivo by recombinant human BMP-2 and recombinant *Xenopus* BMP-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* v.239, p.575-579, 1997.
- 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 & Development*, 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 F, Ventura F, Doody J, Massague J.** Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* v.15, p.3479-3486, 1995.
- 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. *Biology of Reproduction*, v.64, p.171-178, 2001.
- Lucci CM, Amorim CA, Bao SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JR, Gonçalves PBD** Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.56, p.39-49, 1999.
- 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.** TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, v.67, p.753-791, 1998.
- 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* v.49 (Suppl.) p.123-135, 1995.
- McNatty KP, Juengel JL, Wilson T, Galloway SM, Davis GH.** Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reproduction, Fertility and Development* v.13, p.549-555, 2001.
- 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. *Genetics Selection Evolution* v.37, p.25-38, 2005.
- 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, Ten Dijke P, Heldin CH.** TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* v.75, p.115-157, 2000.
- 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. *Developmental Biology* v.213, p.1-17, 1999.
- Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK.** Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* v.175, p.123-130, 2001.
- Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK.** Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* v.188, p.65-73, 2002.
- Nilsson EE, Skinner MK.** Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology of Reproduction* v.69, p.1265-1272, 2003.
- Otsuka F, Yao ZX, Lee TH, 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.
- Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S.** Biological Function and Cellular Mechanism of Bone Morphogenetic Protein-6 in the Ovary. *The Journal of Biological Chemistry* 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* v.11, p.8060-8065, 2002.
- Parrott JA, Skinner MK.** Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* v.140, p.4262-4271, 1999.
- Picton H, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 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. *Bibliotheca Anatômica*, 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 folliculogénèse. *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. *Biology of Reproduction* 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.
- Shaw JM, Cox S-L, Trounson AO, Jenkin G.** Evaluation of the longterm function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Mol Cell Endocrinol* v.161, p.103-10, 2000.
- 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*, 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 Ruminant Research*, 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. *Molecular Reproduction and Development* v.70, p.1-19, 2004.
- Skinner MK.** Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction 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. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, v.3, p.5-12, 2002.
- Suzuki A, Kaneko E, Maeda J, Ueno N.** Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun* v.232, p.153-156, 1997.
- 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.
- Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJThM.** Bone Morphogenetic Proteins. Development and Clinical Efficacy in the Treatment of Fractures and Bone Defects. *J Bone Joint Surg Am* v.87, p.1367-1378, 2005.

- Tilly JL.** Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction* v.1, p.162-172, 1996.
- 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.
- Wang EA, Rosen V, D'alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, Lapan P, Luxenberg DH, Mcquid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM.** Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci* v.87; p.2220-2224, 1990.
- 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. *Biology of Reproduction*, 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. *Molecular Endocrinology* 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.

3 JUSTIFICATIVA

Conforme descrito anteriormente, sabe-se que na fase inicial da foliculogênese ainda existem vários processos pouco conhecidos, sobretudo, no que se refere ao crescimento e maturação de folículos pré-antrais. Os folículos ovarianos pré-antrais representam 90% da população folicular no ovário mamífero e são os precursores dos folículos antrais, os quais chegarão ao estágio pré-ovulatório. Por essa razão, aliado ao pouco que se conhece do processo de desenvolvimento folicular na fase pré-antral, admite-se a necessidade da realização de estudos no sentido de elucidar os mecanismos responsáveis, sobretudo na fase inicial da foliculogênese. Atualmente, já está descrito na literatura que fatores produzidos localmente no ovário podem determinar o início do crescimento folicular, bem como a diferenciação, o acúmulo de organelas citoplasmáticas e a seleção de alguns folículos, enquanto outros permanecem bloqueados. A BMP-7, por exemplo, é considerada reguladora potencial local da função gonadal feminina além de ser extremamente importante para a proliferação celular ovariana, em ratas (LEE *et al.*, 2001). Essa informação sugere que essa proteína seja um fator de extrema importância para o desenvolvimento de folículos pré-antrais *in vitro*, oriundos da espécie caprina.

O papel das BMPs, especialmente, a BMP-7 no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos ainda não foi demonstrado. Neste sentido, acredita-se que a utilização dessa proteína no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais possa fornecer subsídios para uma melhor compreensão acerca dos fatores reguladores da função ovariana, notadamente na fase inicial da foliculogênese. Visando uma melhor avaliação da eficácia do cultivo, além da histologia clássica, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão que é uma técnica mais precisa e permite a avaliação ultra-estrutural dos folículos.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Diante do exposto, formulou-se a seguinte hipótese científica:

A BMP-7 mantém a viabilidade folicular e influencia positivamente na ativação e no crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos após cultivo de curta duração.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral:

Analisar o efeito da BMP-7 sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.

5.2 Específicos:

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de BMP-7 sobre a sobrevivência, ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos;

Analisar morfológica e ultra-estruturalmente os folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.

6 CAPÍTULO 2

**EFEITO DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA-7 (BMP-7) NA
SOBREVIVÊNCIA IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**
*(Effect Of Bone Morphogenetic Protein-7 (Bmp-7) On In Vitro Survival Of Caprine
Preantral Follicles)*

Valdevane Rocha ARAÚJO, Cleidson Manuel Gomes da SILVA, Isabel Bezerra LIMA-
VERDE, Deborah de Melo MAGALHÃES, Gerlane Modesto da SILVA, Khessler Patrícia
Olazia NAME, Sônia Nair BÁO, Cláudio Cabral CAMPELLO, José Roberto Viana SILVA,
Liliam Mara Trevisan TAVARES, José Ricardo de FIGUEIREDO, Ana Paula Ribeiro
RODRIGUES

(artigo submetido à *Pesquisa Veterinária Brasileira*)

Trabalho 1387 MF

(Adapt.p.PVB, solicit.autor, 23.9.08)

**Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro*
survival of caprine preantral follicles¹**

Running head: BMP-7 on *in vitro* survival of caprine preantral follicles

Valdevane Rocha Araújo^{2*}, Cleidson Manuel Gomes da Silva², Isabel Bezerra Lima-Verde²,
Deborah de Melo Magalhães², Gerlane Modesto da Silva², Khessler Patrícia Olazia Name³,
Sônia Nair Bão³, Cláudio Cabral Campello², José Roberto Viana Silva⁴, Liliam Mara Trevisan
Tavares², José Ricardo de Figueiredo² and Ana Paula Ribeiro Rodrigues²

ABSTRACT.- Araújo V.R., Silva M.G., LIMA-Verde I.B., Magalhães D.M., Silva, Name
K.P.O., Bão S.N., Campello C.C., Silva J.R.V., Tavares L.M.T., Figueiredo J.R. & Rodrigues
A.P.R. 2009. **Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of
caprine preantral follicles.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-
Antrais, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza,
CE 60740-000, Brazil. *Corresponding author: val_exclusiva@yahoo.com.br

The aim of this study was to verify the effects of different concentrations of BMP-7 on
in vitro survival and development of caprine preantral follicles. Fragments of caprine ovarian
cortical tissue were cultured for 1 of 7 days in Minimum Essential Medium (MEM⁺)

supplemented with different concentrations of BMP-7 (1, 10, 50 or 100 ng/ml). Non-cultured fragments or those cultured for 1 or 7 days were processed for classical histology and transmission electron microscopy (TEM). Parameters such as follicular survival, activation and growth were evaluated. After 1 or 7 days of culture, the percentage of morphologically normal follicles significantly reduced in all treatments when compared with fresh control, except at 1ng/ml of BMP-7 for 1 day. In addition, the concentration of 10 ng/ml of BMP-7 significantly increased follicular diameter from day 1 to 7 of culture. There was not any influence of the other concentrations of BMP-7 regarding to the follicular and oocyte diameter. Ultrastructural studies confirmed follicular integrity after 7 days of culture in 1 ng/ml BMP-7. In conclusion, small concentrations of BMP-7 can improve the survival of caprine preantral follicles during *in vitro* culture.

INDEX TERMS: Caprine, preantral follicles, culture, survival, BMP-7.

¹ Received on September 23, 2008.

Accepted for publication on

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE 60740-000, Brazil. *Corresponding author: val_exclusiva@yahoo.com.br

³ Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF CEP70.919-970, Brazil,

⁴ Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), Faculdade de Medicina de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Av. Geraldo Rangel, 100/186, Sobral, CE CEP: 60.041-040, Brazil

RESUMO.- [Efeito da Proteína Morphogênica Óssea 7 (BMP-7) para o sobrevivência *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.] O presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito de diferentes concentrações da BMP-7 na sobrevivência e no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Fragmentos de tecido cortical ovariano caprino foram cultivados por 1 ou 7 dias em Meio Essencial Mínimo (MEM⁺) suplementado com diferentes concentrações de BMP-7 (1, 10, 50 ou 100 ng/ml). Os fragmentos não cultivados ou aqueles cultivados por 1 ou 7 dias foram processados para histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão (MET), sendo avaliados vários parâmetros como viabilidade, ativação e crescimento. Os resultados mostraram que o percentual de folículos morfolologicamente normais reduziu significativamente em todos os tratamentos quando comparados ao controle, exceto na concentração de 1ng/ml por 1 dia de cultivo. Já no dia 7 todos os tratamentos reduziram significativamente os percentuais de folículos morfolologicamente normais quando comparados ao controle não cultivado. Utilizando 10 ng/ml de BMP-7 foi observado um aumento significativo no diâmetro folicular quando comparados os diferentes períodos de cultivo. Não houve influência das demais concentrações de BMP-7 quando avaliados além do diâmetro folicular, o diâmetro oocitário. Quando realizada a MET observamos que os folículos cultivados por até 7 dias com 1 ng/ml de BMP-7 apresentavam ultra-estrutura compatível aos do controle fresco, ou seja, apresentavam-se normais. Em conclusão, o BMP-7 em baixas concentrações pode melhorar a sobrevivência e o crescimento durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.

INTRODUCTION

The regulation of folliculogenesis in the mammalian ovary is a complex process and is controlled by both extraovarian factors, e.g. pituitary gonadotropins, and locally produced paracrine factors (Gougeon 1996). While later stages of gonadotropin-dependent follicle

growth have been more thoroughly studied, early stages of folliculogenesis, especially the initiation of follicle growth, remain enigmatic (Danforth et al. 2003). Accumulating evidence during the past decade suggests that the initiation of folliculogenesis is a continuous process regulated by a variety of endocrine and intra-ovarian factors. One of these factors is the bone morphogenetic protein (BMP), which is a member of transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, representing a specific subfamily. Up to date, 15 BMPs were described, being only seven (BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 e -15) localized in mammalian ovaries (Hogan 1996, Wozney & Rosen 1998, Dube et al. 1998). These proteins are signalized by extracellular molecules and are involved in the regulation of growth, differentiation and apoptosis of several cellular types and play a role in folliculogenesis and ovulation (Glister et al. 2004).

In situ hybridization studies demonstrated the presence of the mRNA of BMP-7 in theca cells of rat preovulatory follicles (Shimasaki et al. 1999) and in pituitary cells of transgenic mouse (Huang et al. 2001). In addition, Huang et al. (2001), using RT-PCR, identified mRNA for BMP-7 in mouse pituitary cells. BMP acts through BMPR-IA, -IB and II receptors, which were identified and localized in different structures of swine ovary, such as oocyte, granulosa and luteinic cells and blood vessels (Quinn et al. 2004). Studies in rats demonstrated that BMP-7 receptors are expressed in granulosa cells of secondary and antral follicles, also showing that this protein is expressed in theca cells (Shimasaki et al. 1999).

In mouse, in vitro studies demonstrated that BMP-7 is involved in the control of oocyte growth, granulosa cell proliferation (Lee et al. 2001), as well as in the transition from primordial to primary stage (Lee et al. 2004). Apart from these previous information on BMP-7, the action of this protein in mammalian reproduction is still poorly known. Moreover, no evidence of BMP-7 action on the germinative cells was verified in the caprine specie. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of BMP-7 on in vitro survival and development of caprine preantral follicles.

MATERIALS AND METHODS

Unless mentioned otherwise, the culture media, BMP-7 and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

Source of ovaries

Ovarian cortical tissues were obtained from five cross-breed goats (n=5) collected at a local slaughterhouse. Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 seconds followed by two times in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The pairs of ovaries were transported within 1 hour to the laboratory in MEM at 4°C (Chaves et al. 2008).

Experimental protocol

The culture system was described in detail earlier by our team (Silva et al. 2004, Matos et al. 2007a). Ovarian cortical tissue from the same ovarian pair was cut in 11 slices (3mm x 3mm x 1mm) using a scissor and scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were then either directly fixed for histological and ultrastructural analysis (fresh tissue, control) or placed in culture for 1 or 7 days. Caprine tissues were transferred to 24-well culture dishes containing 1ml of culture media. Culture was performed at 39°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. The basic culture medium consisted of MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with ITS (insulin 6.25 ng/ml, transferrin 6.25 ng/ml and selenium 6.25 ng/ml), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25 mg/ml of bovine serum albumin (BSA). To test the effects of BMP-7, different concentrations (0, 1, 10, 50 or 100

ng/ml) of this factor were added to the culture medium. Each treatment was repeated five times and the culture media was replaced every other day.

Morphological analysis and assessment of in vitro follicular growth

Before culture (fresh control) and after one or seven days in culture, all the pieces were fixed in 10% formalin for 12 h and then dehydrated in increasing concentrations of ethanol. After paraffin (Synth, São Paulo, Brazil) embedding, the caprine tissues pieces were cut into 7 μm sections and stained by Periodic Acid Schiff - hematoxylin. Follicle stage and survival were assessed microscopically on serial sections. Coded anonymized slides were examined on a microscope light (Nikon, Japan) under 400 x magnification.

The follicles were classified as described by Hulshof et al. (1994) in primordial (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte), or growing follicles i.e., primary (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte), or secondary (oocyte surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells). These follicles were classified individually as histologically normal when an intact oocyte was present, i.e. an oocyte without a pyknotic nucleus or cytoplasmic retraction, surrounded by granulosa cells, which are well organized in one or more layers without pyknotic nucleus. Atretic follicles were defined as those with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane. Overall, 150 follicles were evaluated for each treatment (30 follicles per treatment in one repetition x 5 repetitions = 150 follicles).

The percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in each medium. In addition, follicle and oocyte diameters were measured only in healthy follicles. Follicle diameter was recorded from edge to edge of granulosa cell membrane, or from the outside edge of the theca cell layer when present.

Oocyte diameter was recorded from edge to edge of the oocyte membrane. Two perpendicular diameters were recorded for each and the average of these two values was reported as follicle and oocyte diameters, respectively.

Ultrastructural analysis of caprine preantral follicles

For better evaluation of the follicular morphology, ultrastructural studies were carried out on fragments of fresh control and treatments that maintained follicular morphology during the histological analysis. Small pieces (1mm^3) of caprine ovarian tissues were fixed in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 4 h at room temperature. After fixation, fragments were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h. Subsequently, the samples were dehydrated through a gradient of acetone solutions and the tissues were embedded in Spurr is resin. Semi thin sections ($3\ \mu\text{m}$) were cut on an ultramicrotome (Reichert Supernova, Heidelberg, Germany) for light microscopy studies and stained with toluidine blue. The ultra-thin sections (60–70 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) transmission electron microscope. Parameters such as density and integrity of ooplasmic and granulosa cell organelles, vacuolization and basement membrane integrity were evaluated.

Statistical analysis

Means of percentages surviving follicles at all stages, primordial and developing (primary or secondary) obtained after 1 or 7 days in the various treatments were subjected to analysis of variance (ANOVA) using GLM procedure of SAS (1999) and Dunnett's test applied to compare BMP-7 treated groups against control and MEM⁺. The Student-Newman-

Keels (SNK test) was used to compare BMP-7 concentrations, days of culture and diameter of oocytes and follicles among the treatments were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by SNK. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$ and results were expressed as mean \pm standard error of means (SEM) (Steel et al. 1997).

RESULTS

Effect of BMP-7 on follicle survival

In the present study, a total of 1,650 preantral follicles were analyzed. Primordial follicles were the most abundant type found in non-cultured ovarian tissue (fresh control, Fig.1). Figure 2 shows the effect of different concentrations of BMP-7 on the follicular survival, i.e. the percentage of morphologically normal follicles in the fresh control and after 1 or 7 days of culture in caprine ovarian tissue. When the comparisons were done in the same culture period, it was verified that only the medium supplemented with 1 ng/ml of BMP-7 after 1 day of culture maintained follicular survival similar ($P > 0.05$) to the observed in fresh control (non-cultured tissue). The others treatments significantly reduced ($P < 0.05$) the percentage of morphologically normal follicles after 1 or 7 days of in vitro culture compared with fresh control. Nevertheless, addition of BMP-7 to the medium did not show significant differences in the percentage of normal follicles when compared with MEM⁺ alone in both culture periods ($P > 0.05$). Comparisons done among the treatments with different concentrations of BMP-7, after 1 or 7 days of culture, showed that only the concentration of 1 ng/ml significantly increases ($P < 0.05$) the percentage of normal follicles compared with the others treatments, except when compared with 10 ng/ml.

Goat primordial follicle activation and growth during *in vitro* culture

The percentages of primordial and growing follicles in non-cultured cortex were 77.64% and 22.36%, respectively (Table 1). In all treatments, after one or seven days of culture, there was no significant effect of BMP-7 in the follicular activation, i.e., in the percentage of primordial and growing follicles ($P < 0.05$).

Follicular and oocyte diameter before and after *in vitro* culture were shown in Table 2. When the ovarian tissue was cultured only in MEM⁺ or added with 10 ng/ml of BMP-7, it was observed a significant increase in follicular diameter from day 1 to 7 ($P < 0.05$). However, no significant differences were observed among the treatments, as well as when compared with fresh control ($P > 0.05$). Regarding to the oocyte diameter, we did not observe any influence of BMP-7 in both culture periods ($P > 0.05$).

Ultrastructural analysis of goat preantral follicles

To better evaluation of follicular quality, ultrastructural analysis was performed using morphologically normal preantral follicles from fresh control, as well as from treatments that did not differ from control after 1 or 7 days of culture according to previous histological analysis (tissues cultured in BMP-7 at 1 ng/ml). Figures 3A and 3B showed normal follicles observed in fresh control and after 7 days of culture in 1 ng/ml of BMP-7, respectively. In these follicles, it was cleared observed the presence of some vacuoles and several cytoplasmic organelles (especially, mitochondrias and endoplasmic reticulum) without degeneration signals, as well as the integrity of basal and nuclear membranes.

DISCUSSION

In the present study, it was demonstrated the importance of BMP-7 on the *in vitro* survival of caprine preantral follicles cultured for 7 days. The concentrations of BMP-7 used

in this experiment (1, 10, 50 and 100 ng/ml) were based on physiological concentrations of BMP-7 in rat ovaries (Shimasaki et al. 1999), as well as in studies with the direct injection of BMP-7 in the ovarian bursa (Lee et al. 2001) and in vitro culture of mouse ovaries (Lee et al. 2004).

It was observed that follicles cultured for 1 day in the presence of 1 ng/ml of BMP-7 maintained the viability similar to that observed in non-cultured follicles (fresh control). Nevertheless, the other concentrations of BMP-7 significantly reduced the percentage of morphologically normal follicles compared with fresh control, except at 10 ng/ml, which results did not differ from any other concentrations tested in the present study. In rats, BMP-7 and BMP-15 stimulated DNA synthesis by granulosa cells of primary follicles in vitro cultured. However, only BMP-7 maintained this stimulus when the granulosa cells were cultured together with the oocytes (Otsuka & Shimasaki 2002). According to Dooley et al. (2000), BMPs are likely to play an autocrine and paracrine effect by granulosa and theca cells, respectively. In addition, BMP-6 and BMP-7 increase the secretion of FSH in the pituitary cells (Huang et al. 2001). Similar results to ours were observed by Lee et al., (2004), which cultivated mouse ovaries with BMP-7 and maintained follicular viability up to day 4 of culture.

Evaluating the effect of BMP-7 on the follicular activation and growth, it was observed that this substance did not affect the number of developing follicles in goats. Although BMP-7 did not promote follicular and oocyte growth in both culture periods, MEM⁺ and BMP-7 at 10 ng/ml increase follicular diameter from day 1 to 7, which was not observed in oocyte diameter. Nevertheless, in vivo, Lee et al. (2001) demonstrated that direct injection of BMP-7 in the mouse ovarian bursa leads to an increase in the number of developing follicles, reducing the number of primordial ones. These contradictory results can be explained by differences among species and protocols tested. Recently, in vitro studies

showed that 100 ng/ml of BMP-7, in the presence of FSH, promoted the transition from primordial to primary follicles in mouse, suggesting that BMP-7 can play a role in follicular activation when associated with FSH (Lee et al. 2004).

Our results regarding to the percentage of normal follicular morphology were confirmed by ultrastructural analysis. After TEM, it was observed that in addition to basal and nuclear membranes, important structures such as mitochondrias, endoplasmic reticulum and granulosa cells were preserved even after 7 days of culture in the presence of 1 ng/ml of BMP-7. Similar results were described previously after in vitro culture of caprine preantral follicles for 7 days in medium containing FSH (Matos et al. 2007a). However, the later authors showed that caprine follicles cultured in medium without addition of FSH (control) presented ultrastructural alterations.

It is concluded that BMP-7, at the concentration of 1 ng/ml, maintains the survival and ultrastructure of preantral follicles after 7 days of caprine ovarian tissue culture.

Acknowledgments.- This study was supported by grants from CNPq, CAPES and Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP). Valdevane R. Araújo is a recipient of a grant from CAPES (Brazil). The authors also thank Ms. J.B. Bruno, Ms. R.N. Chaves and Dr. M.H.T. Matos for his advice in edditing the manuscript.

REFERENCES

Chaves R.N., Martins F.S., Saraiva M.V.A., Celestino J.J.H., Lopes C.A.P., Correia J.C., Lima-Verde I.B., Matos M.H.T., Bão S.N., Name K.P.O., Campello C.C., Silva J.R.V. & Figueiredo J.R. 2008. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 20:640-647.

- Danforth D.R., Arbogast L.K., Ghosh S., Dickerman A., Rofagha R. & Friedman C.I., 2003. Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol. Reprod.* 68:1736-1741.
- Dooley C.A., Attia G.R., Rainey W.E., Moore D.R. & Carr R. 2000. Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:3331-3337.
- Dube J.L., Wang P., Elvin J., Lyons K.M., Celeste A.J. & Matzuk M.M. 1998. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol. Endocrinol.* 12:1809-1817.
- Glister C., Kemp C.F. & Knight P.G. 2004. 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* 127:239-254.
- Gougeon A., 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17:121-155.
- Hogan B.L. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes and Development* 10:1580-1594.
- Huang H.-J., Wu J.C., Su P., Zhirnov O. & Miller W.L. 2001. A novel role for morphogenetic proteins in the synthesis of Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrinology* 142:2275-2283.
- Hulshof C.J., Figueiredo J.R., Beckers J.F., Bevers M.M. & Van Den Hurk R. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet. Quart.* 16:78-80.
- Lee W-S., Otsuka F., Moore R.K. & Shimasaki S. 2001. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol. Reprod.* 65:994-999.

- Lee W-S., Yoon S-J., Yoon T-K., Cha K-Y., Lee S-H., Shimasaki S., Lee S. & Lee K-A. 2004. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 69:159-163.
- Matos M.H.T., Lima-Verde I.B., Luque M.C.A., Maia Jr J.E., Silva J.R.V., Celestino J.J.H.m Martins F.S., Bao S.N., Lucci C.M. & Figueiredo J.R. 2007a. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote* 15:173-182.
- Matos M.H.T., Lima-Verde I.B., Bruno J.B., Lopes, C.A.P., Martins F.S., Santos K.D.B., Rocha R.M.P., Silva J.R.V., Bao S.N. & Figueiredo J.R. 2007b. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 19:677-684.
- Otsuka F. & Shimasaki S. 2002. 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.* 11:8060-8065.
- Quinn R.L., Shuttleworth G. & Hunter M.G. 2004. Immunohistochemical localization of the bone morphogenetic protein receptors in the porcine ovary. *J. Anat.* 205:15-23.
- Steel R.G.D., Torrie J.H. & Dickey D. 1997. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 3rd ed. McGraw-Hill, New York.
- Shimasaki S., Zachow R.J., Li,D., Kim,H., Iemura,S-I, Ueno,N., Sampath,K., Chang R.J. & Erickson,G.F. 1999. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc. Natl Acad. Sci.* 96:7282-7287.
- Silva J.R.V., Van den Hurk R., Matos M.H.T., Santos R.R., Pessoa C., Moraed M.O. & Figueiredo J.R. 2004. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* 61:1691-1704.

Wozney J.M. & Rosen V. 1998. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin. Orthop.* 346:26-37.

Table 1. Percentages (mean \pm SEM) of primordial and growing follicles (primary and secondary) in non-cultured tissues and in tissues cultured for 1 or 7 days in MEM⁺ (control medium) and MEM⁺ supplemented with various concentrations of BMP-7

| Treatments | Primordial follicles | | Growing follicles | |
|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Non-cultured (Day 0) | 77.64 \pm 25.09 | | 22.36 \pm 25.09 | |
| Cultured | Day 1 | Day 7 | Day 1 | Day 7 |
| MEM ⁺ | 83.27 \pm 19.60 | 57.28 \pm 26.60 | 16.73 \pm 19.60 | 42.72 \pm 26.60 |
| BMP-7 (1) | 75.46 \pm 13.04 | 59.63 \pm 38 | 24.54 \pm 13.04 | 40.37 \pm 23.39 |
| BMP-7 (10) | 82.17 \pm 11.43 | 64.09 \pm 30.99 | 17.83 \pm 11.43 | 35.91 \pm 30.99 |
| BMP-7 (50) | 66.42 \pm 13.21 | 69.37 \pm 19.44 | 33.58 \pm 13.21 | 30.63 \pm 19.45 |
| BMP-7 (100) | 78.74 \pm 11.04 | 57.83 \pm 12.69 | 25.90 \pm 14.10 | 42.17 \pm 12.69 |

Table 2. Follicle and oocyte diameters (mean \pm S.E.M.) in non-cultured tissues and in tissues cultured for 1 or 7days in MEM⁺ (control medium) and MEM⁺ supplemented with various concentrations of BMP-7

| Treatments | Follicle diameter (μm) | | Oocyte diameter (μm) | |
|----------------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Non-cultured (Day 0) | 77.4 \pm 11.2 | | 60.8 \pm 6.7 | |
| Cultured | Day 1 | Day 7 | Day 1 | Day 7 |
| MEM ⁺ | 74.5 \pm 9.2 ^A | 82.2 \pm 13.4 ^B | 57.5 \pm 5.8 ^A | 58.9 \pm 8.1 ^A |
| BMP-7 (1) | 79.7 \pm 9.0 ^A | 85.4 \pm 9.6 ^A | 61.8 \pm 5.5 ^A | 63.0 \pm 7.7 ^A |
| BMP-7 (10) | 78.3 \pm 8.4 ^A | 86.8 \pm 10.5 ^B | 58.7 \pm 6.2 ^A | 61.6 \pm 5.2 ^A |
| BMP-7 (50) | 80.6 \pm 8.4 ^A | 78.8 \pm 10.7 ^A | 60.6 \pm 6.1 ^A | 59.0 \pm 6.9 ^A |
| BMP-7 (100) | 81.8 \pm 6.1 ^A | 84.8 \pm 16.4 ^A | 61.8 \pm 2.9 ^A | 64.0 \pm 8.9 ^A |

(A,B) Different letters in the same row denote significant differences between culture periods within the same medium (P<0.05).

Figures

Fig.1. Histological section of non-cultured tissue after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin, showing normal follicles. O = oocyte, NU = oocyte nucleus, GC = granulosa cells (400x).

Fig.2. Percentages (means \pm SEM) of histologically normal preantral follicles in non-cultured tissue (control) and in tissue cultured for 1 and 7 days in MEM⁺ and MEM⁺ supplemented with 1, 10, 50 and 100ng/ml BMP-7.

Fig.3. Electron micrograph of a preantral follicle from (A) a non-cultured control (7800x) and (B) cultured in BMP-7 (1ng/ml) for 7 days (1800x). Note the homogeneous cytoplasm with numerous rounded mitochondria. NU = oocyte nucleus, GC = granulosa cells, m = mitochondria, ser = smooth endoplasmic reticulum, v = vesicle.

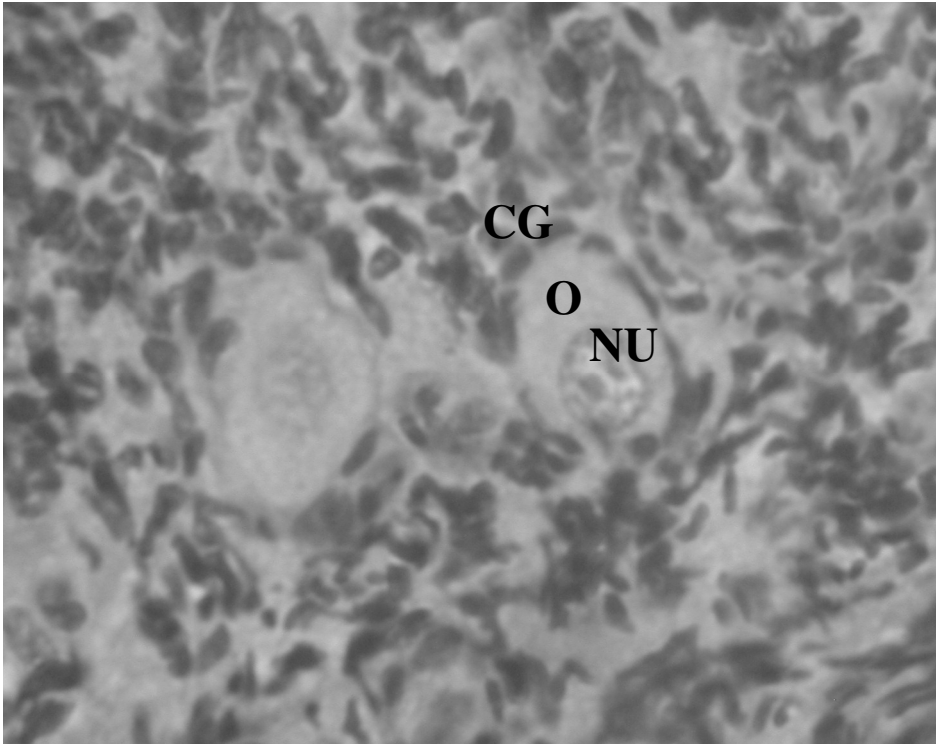


Figure 1.

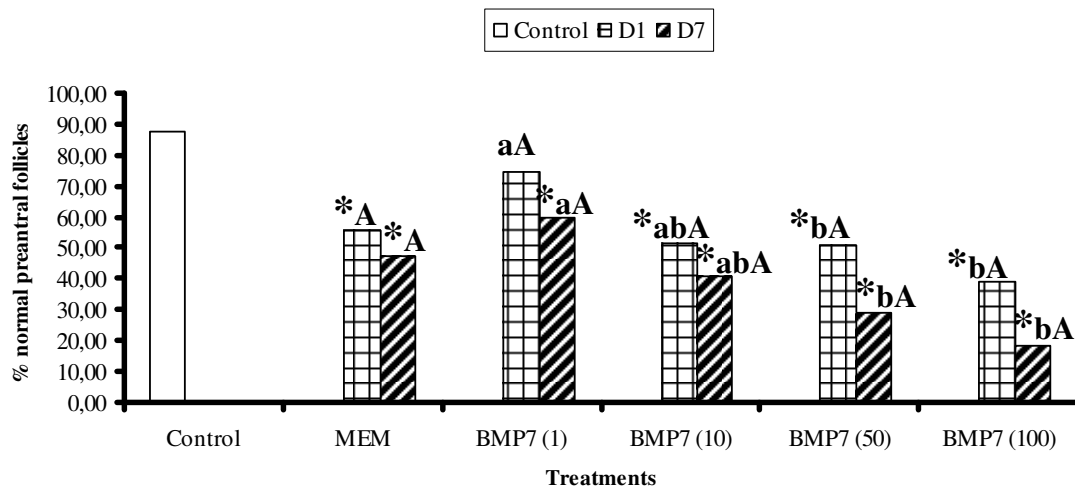


Figure 2.

* $P < 0.05$, significantly different from non-cultured ovarian cortex tissue (control/D0).

(a,b) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$).

(A,B) Different letters denote significant differences between culture periods within the same medium ($P < 0.05$).

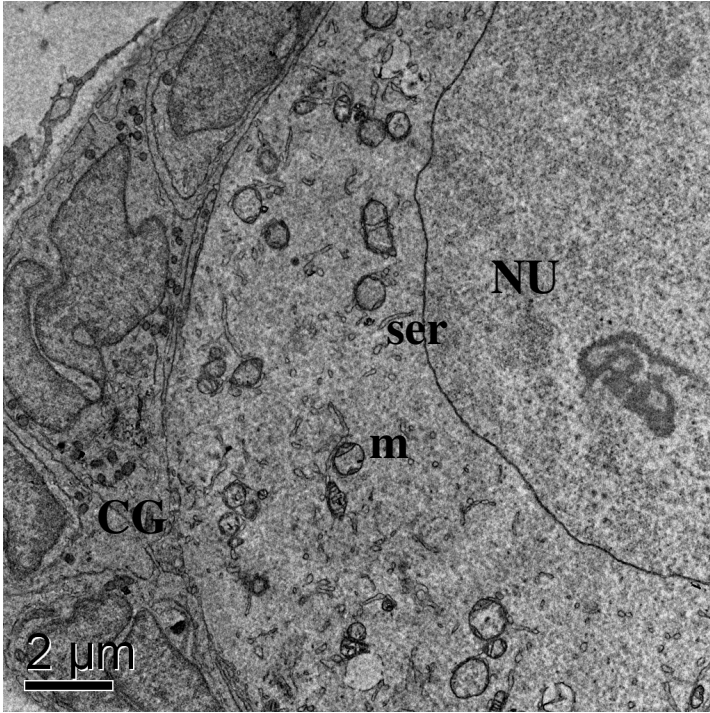


Figure 3A.

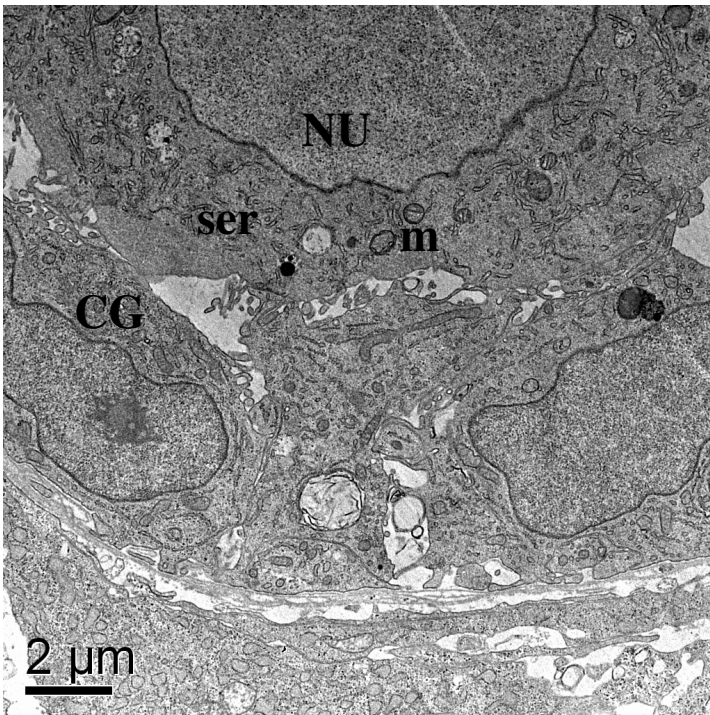


Figure 3B.

7 CONCLUSÃO GERAL

Pode-se concluir com este trabalho que a BMP-7 em baixas concentrações (1 ng/ml) mantém a sobrevivência e a ultra-estrutura de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* por até 7 dias em tecido ovariano caprino.

8 PERSPECTIVAS GERAIS

A aplicação da biotécnica de MOIFOPA, atualmente, permite demonstrar o papel de diversas substâncias envolvidas no processo de foliculogênese. Os bons resultados obtidos neste trabalho utilizando a BMP-7 podem ser de grande valia para elaboração de meios de cultivo de base visando à obtenção de oócitos maduros a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Entretanto, para alcançar este objetivo fazem-se necessários futuros estudos envolvendo a interação da BMP-7 com hormônios e fatores de crescimento.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; RODRIGUES, A.P.R.; CARVALHO, F.C.A.; FIGUEIREDO, J.R.; RONDINA, D.; CECCHI, R.; GIORGETTI, A.; ARTINI, A.; GONÇALVES, P.B.D. **Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries.** *Theriogenology*, v. 53, p. 1251-1262, 2000.
- AONO, A.; HAZAMA, M.; NOTOYA, K.; TAKETOMI, S.; YAMASAKI, H.; TSUKUDA, R.; SASAKI, S.; FUJISAWA, Y. **Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer.** *Biochem Biophys Res Commun* v.210, p.670-677, 1995.
- ARUNAKUMARI, G.; VAGDEVI, R.; RAO, B.S.; NAIK, B.R.; NAIDU, K.S.; HUMAR, R.V.S.; RAO, V.H. **Effect of hormones and growth factors on in vitro development of sheep preantral follicles.** *Small Ruminant Research* v.70, p.93-100, 2007.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. **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.
- BARROS, L.F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. **Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.130, p.401-409, 2001.
- BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B.; XU, K.P.; KING, W.A. **Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro.** *Journal of Reproduction and Fertility* v.38, p.87-98, 1989.
- BOLAND, N.I.; HUMPHERSON, P.G.; LEESE, H.J.; GOSDEN, R.G. **Characterization of follicular energy metabolism.** *Human Reproduction* v. 9, p.604-609, 1994.
- BRANKIN, V.; QUINN, R.L.; WEBB, R.; HUNTER, M.G. **Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary.** *Domest Anim Endocrinol* v.28, p.367-379, 2005.

BRANKIN, V.; QUINN, R.L.; WEBB, R.; HUNTER, M.G. **BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells.** Domestic Animal Endocrinology, v. 29, p. 593-604, 2005.

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, 165-171, 1997.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. **Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*).** Theriogenology v.66, p.5-13, 2006.

CALONGOS, G.; HASEGAWA, A.; KOMORI, S.; KOYAMA, K. **Comparison of urinary and recombinant folliclestimulating hormone in in vitro growth, maturation, and fertilization of mouse preantral follicles.** Fertil Steril, v.89, p. 1482-1489, 2008.

CAMPBELL, B.K.; de SOUZA, C.J.H.; SKINNER, A.; BAIRD, D.T. **Effect of the FecB Mutation on the response of ovarian somatic cells to stimulation by bone morphogenic proteins (BMP).** Biol Reprod, Special Issue: 37th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction Vancouver, Canada, p 270, 2004.

CHANG, H.; BROWN, C.W.; MATZUK, M.M. **Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily.** Endocr Rev v.23, p.787-823, 2002.

CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; CORREIA, J.C.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; BÁO S.N., NAME K.P.O., CAMPELLO C.C., SILVA J.R.V.; FIGUEIREDO J.R. **Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro.** Reprod. Fertil. Dev. v.20, p.640-647, 2008.

DANFORTH, D.R.; ARBOGAST, L.K.; GHOSH, S.; DICKERMAN, A.; ROFAGHA, R.; FRIEDMAN, C.I. **Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary.** Biol. Reprod. v.68, p.1736-1741, 2003.

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, C.A.; ATTIA, G.R.; RAINEY, W.E.; MOORE, D.R.; CARR, R. **Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production.** J. Clin Endocrinol Metab v.85, p.3331-3337, 2000.

DUBE, J.L.; WANG, P.; ELVIN, J.; LYONS, K.M.; CELESTE, A.J.; MATZUK, M.M. **The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes.** Mol Endocrinol v.12, p.1809-1817, 1998.

ELVIN, J.A.; YAN, C.; MATZUK, M.M. **Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility.** Molecular and Cellular Endocrinology v.159, p.1-5, 2000.

EPPIG, J.J. **Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells.** Bioessays v.13, p.569-574, 1991.

EPPIG, J.J.; CHESNEL, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, F.L.; WATANABE, S.; WIGGLESWORTH, K. **Oocyte control of granulosa cell development: how and why.** Hum Reprod v.12, p.127-132, (abstract), 1997.

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

ERICKSON, G.F. **An analysis of follicle development and ovum maturation.** Seminars in reproductive endocrinology, v. 4, p. 233-254, 1986.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. **The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle.** Reproductive Biology and Endocrinology, v. 1, p. 1-20, 2003.

ERICKSON, G.F.; WILLIAMS, C.J. **Morphology and physiology of the ovary.** Endotext, Chapter 2, 2008.

FAIR, T.; HYTTEL, P. **Oocyte growth in cattle-ultrastructure, transcription and developmental competence.** In: MOTTA P.M. (Ed.), *Microscopy of Reproduction and Development: A Dynamic Approach.* Antonio Delfino, Rome, p.109-118, 1997.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTEL, P.; BOLAND, M.; GREVE, T. **Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles.** *Anat Embryol* v.195, p.327-336. 1997.

FAIR, T. **Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence.** *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 203-216, 2003.

FARBER, J.L. **Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis.** *Laboratory Investigation*, v. 47, p. 114-123, 1982.

FATEHI, A.N.; VAN DEN HURK, R.; COLENBRANDER, B.; DAEMEN, A.J.J.M.; VAN TOL, H.T.A.; MONTEIRO, R.M.; ROELEN, B.A.J.; BEVERS, M.M. **Expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), 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.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. **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, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. **Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA.** In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Editora Roca, p.303-327, 2008.

FINDLAY, J.K.; DRUMMOND, A.E.; DYSON, M.L.; BAILLIE, A.J.; ROBERTSON, D.M.; ETHIER, J.F. **Recruitment and development of the follicle the roles of the transforming growth factor-beta superfamily.** *Mol Cell Endocrinol* v.191, p.35-43, 2002.

FLAWS, J.A.; ABBUD, R.; MANN, R.J.; NILSON, J.H.; HIRSHFIELD, A.N. **Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary.** *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1233-1237, 1997.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. **Oocyte-somatic cell interaction during follicle development in mammals.** *Animal Reproduction Science* v. 82-83, p.431-446, 2004.

GLISTER, C.; KNIGHT, P.G. **Immunocytochemical evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) signaling system in bovine antral follicles.** *Reproduction Abstract Series* v.29, p.5 (abstract 4), 2002.

GLISTER, C.; KEMP, C.F.; KNIGHT, P.G. **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.

GOOK, D.A.; EDGAR, D.H.; BORG, J.; MARTIC, M. **Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis.** *Human Reproduction*, v.23, p.394-402, 2008.

GOUGEON, A. **Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses.** *Endocr. Rev.* v.17, p.121-155, 1996.

GRIFFITH, D.L.; KECK, P.C.; SAMPATH, T.K.; RUEGER, D.C.; CARLSON, W.D. **Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor β superfamily.** *Proc Natl Acad Sci* v.93, p.878-883, 1996.

GUPTA, P.S.P.; RAMESH, H.S.; MANJUNATHA, B.M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J.P. **Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro growth preantral follicles.** *Zygote*, v.16, p.57-63, 2008.

HINO, J.; TAKAO, M.; TAKESHITA, N.; KONNO, Y.; NISHIZAWA, T.; MATSUO, H. **cDNA cloning and genomic structure of human bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b)**. *Biochem Biophys Res Commun* v.223, p.304-310, 1996.

HIRSHFIELD, A.N. **Development of follicles in the mammalian ovary**. *Int Rev Cytol* v. 124, p. 43-101, 1991.

HOGAN, B.L. **Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development**. *Genes and Development* v.10, p.1580-1594, 1996.

HSU, S.Y.; HSUEH, A.J. **Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm**. *Physiological Reviews* v.80, p.593-614, 2000.

HUANG, H-J.; WU, J.C.; SU, P.; ZHIRNOV, O. MILLER, W.L. **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.

HULSHOF, S.C.; DIJKSTRA, G.; VAN DER BEEK, E.M.; BEVERS, M.M.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; VAN DEN HUK, R. **Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y in the bovine ovary**. *Biology of Reproduction*, v.50, p.553-560, 1994.

IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2006.

INGRAM, D.I. **Atresia**. In: **Zuckerman, S. (Ed.), The Ovary**. Academic Press, New York, p. 247-273, 1962.

IRELAND, J.J. **Control of follicular growth and development**. *Journal of Reproduction and Fertility* V. 34 (suppl), p. 39-54, 1987.

ISHIDOU, Y.; KITAJIMA, I.; OBAMA, H.; MARUYAMA, I.; MURATA, F.; IMAMURA, T.; YAMADA, N.; TEN DIJKE, P.; MIYAZONO, K.; SAKOU, T. **Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation.** J Bone Miner Res v.10, p.1651-2659, 1995.

ISRAEL, D.I.; NOVE, J.; KERNS, K.M.; MOUTSATSOS, I.K.; KAUFMAN, R.J. **Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells.** Growth Factors, v.7, p.139-150, 1992.

ISRAEL, D.I.; NOVE, J.; KERNS, K.M.; KAUFMAN, R.J.; ROSEN, V.; COX, K.A.; WOZNEY, J.M. **Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo.** Growth Factors v.13, p.291-300, 1996.

ITOH, S.; ITOH, F.; GOUMANS, M.J.; TEN DIJKE, P. **Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins.** Eur J Biochem v.267, p.6954-6967, 2000.

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.** Biology of Reproduction v.67, p.1099-1105, 2002.

JAATINEN, R.; BONDESTAM, J.; RAIVIO, T.; HILDEN, K.; DUNKEL, L.; GROOME, N.; RITVOS, O. **Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin bB-subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism v.87, p.1254-1261, 2002.

JONES, W.K.; RICHMOND, E.A.; WHITE, K.; SASAK, H.; KUSMIK, W.; SMART, J.; OPPERMAN, H.; RUEGER, D.C.; TUCKER, R.F. **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, J.L.; READER, K.L.; BIBBY, A.H.; LUN, S.; ROSS, I.; HAYDON, L.J.; McNATTY, K.P. **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, 2006.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. **Recent achievements in in vitro culture and preservation of ovarian follicles in mammals.** *Reproductive Biology*, v.6, p.3-16, 2006.

KAWABATA, M.; IMAMURA, T.; INOUE, H.; HANAI, J.; NISHIHARA, A.; HANYU, A.; TAKASE, M.; ISHIDOU, Y.; UDAGAWA, Y.; OEDA, E.; GOTO, D.; YAGI, K.; KATO, M.; MIYAZONO, K. **Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins.** *Ann NY Acad Sci* v.886, p.73-82, 1999.

KNIGHT, P.G.; 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.

KUSUMOTO, K.; BESSHO, K.; FUJIMURA, K.; AKIOKA, J.; OGAWA, Y.; IIZUKA, T. **Comparison of ectopic osteoinduction in vivo by recombinant human BMP-2 and recombinant Xenopus BMP-4/7 heterodimer.** *Biochem Biophys Res Commun* v.239, p.575-579, 1997.

LAWSON, K.A.; DUNN, N.R.; ROELEN, B.A.J.; ZEINSTRA, L.M.; DAVIS, A.M.; WRIGHT, C.V.E.; KORVING, J.P.W.F.M.; HOGAN, B.L.M. **BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo.** *Genes & Development*, v. 13, p.424-436, 1999.

LEE, W-S.; OTSUKA, F.; MOORE, R.K.; SHIMASAKI, S. **Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat.** *Biology of Reproduction*, 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.** *Molecular Reproduction and Development*, v. 69, p. 159-163, 2004.

LIU, F.; VENTURA, F.; DOODY, J.; MASSAGUE, J. **Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs.** Mol Cell Biol v.15, p.3479-3486, 1995.

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.** Biology of Reproduction, v. 64, p. 171-178, 2001.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. **Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles.** Animal Reproduction Science, v. 56, p. 39-49, 1999.

LYONS, K.M.; PELTON, R.W.; HOGAN, B.L. **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. **TGF-beta signal transduction.** Annu Rev Biochem, v.67, p.753-791, 1998.

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

MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.A.; MAIA JR., J.E.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.M.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO J.R. **Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro.** Zygote v.15, p.173-182, 2007.

MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; BRUNO, J.B.; LOPES, C.A.P.; MARTINS, F.S.; SANTOS, K.D.B.; ROCHA, R.M.P.; SILVA, J.R.V.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO J.R. **Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro.** Reprod. Fertil. Dev. v.19, p.677-684, 2007.

MCNATTY, K.P.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; TISDALL, D.J.; 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 v.49 (Suppl.) p.123-135, 1995.

MCNATTY, K.P.; JUENGEL, J.L.; WILSON, T.; GALLOWAY, S.M.; DAVIS, G.H. **Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep.** Reproduction, Fertility and Development v.13, p.549-555, 2001.

MCNATTY, K.P.; GALLOWAY, S.M.; WILSON, T.; SMITH, P.; HUDSON, N.L.; O'CONNELL, A.; BIBI, A.H.; HEATH, D.A.; DAVIS, G.H.; HANRAHAN, J.P.; JUENGEL, J.L. **Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep.** Genetics Selection Evolution v.37, p.25-38, 2005.

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.; TEN DIJKE, P.; HELDIN, C.H. **TGF- β signaling by Smad proteins.** Adv Immunol v.75, p.115-157, 2000.

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, J.L. **Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass.** Developmental Biology v.213, p.1-17, 1999.

NILSSON, E.; PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. **Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis.** Mol Cell Endocrinol v.175, p.123-130, 2001.

NILSSON, E.E.; KEZELE, P.; SKINNER, M.K. **Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries.** Mol Cell Endocrinol v.188, p.65-73, 2002.

NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. **Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development.** Biology of Reproduction v.69, p.1265-1272, 2003.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T-H.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. **Bone Morphogenetic Protein-15: Identification of target cells and biological functions.** The Journal of Biological Chemistry, v. 275, p. 39523-39528, 2000.

OTSUKA, F.; MOORE, R.K.; SHIMASAKI, S. **Biological Function and Cellular Mechanism of Bone Morphogenetic Protein-6 in the Ovary.** The Journal of Biological Chemistry, 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 v.11, p.8060-8065, 2002.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. **Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis.** Endocrinology v.140, p.4262-4271, 1999.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. **The molecular basis of oocyte growth and development.** Molecular and Cellular Endocrinology 145:27-37, 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, R.L.; SHUTTLEWORTH, G.; HUNTER, M.G. **Immunohistochemical localization of the bone morphogenetic protein receptors in the porcine ovary.** J. Anat, v. 205. 15-23, 2004.

RANKIN, T.L.; 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.** Bibliotheca Anatômica, v. 24, p. 77-92, 1983.

RUUTIAINEN K, ADASHI EY. **Intraovarian factors in hyperandrogenism.** Semin Reprod Endocrinol, v.11, p.324-328, 1993.

SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; BRUNO, J.B.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SILVA, G.M.; PORFÍRIO, E.P.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. **Influence of different concentrations of LH and FSH on in vitro caprine primordial ovarian follicle development.** Small Ruminant Research, v. 78, p. 87-95, 2008.

SAUMANDE, J. **Ovogenèse et folliculogenèse.** 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.** Biology of Reproduction 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.

SHAW JM, COX S-L, TROUNSON AO, JENKIN G. **Evaluation of the longterm function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications.** Mol Cell Endocrinol v.161, p.103-10, 2000.

SHIMASAKI, S., ZACHOW, R.J., LI, D., KIM, H., IEMURA, S-I., UENO, N., SAMPATH, K., CHANG, R.J., ERICKSON, G.F. **A functional bone morphogenetic protein system in the ovary.** Proc. Natl. Acad. Sci., 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, J.R.V, FERREIRA, M.A.L., COSTA, S.H.F., SANTOS, R.R., CARVALHO, F.C.A, RODRIGUES, A.P.R., LUCCI, C.M., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R. **Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats.** Small Ruminant Research, v. 43, p. 203-209, 2002.

SILVA J.R.V., VAN DEN HURK R., MATOS M.H.T., SANTOS R.R., PESSOA C., MORAED M.O.; FIGUEIREDO J.R. **Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue.** Theriogenology v.61, p.1691-1704, 2004.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. V. **Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats.** Molecular Reproduction and Development, v. 70, p. 11-19, 2004.

SKINNER MK. **Regulation of primordial follicle assembly and development.** Human Reproduction 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.

STEEL R.G.D., TORRIE J.H. & DICKEY D. **Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 3rd ed.** McGraw-Hill, New York, 1997.

SUH, C.S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G.F. **The ovarian life Cycle: A contemporary view.** Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders, v. 3, p. 5-12, 2002.

SUZUKI A, KANEKO E, MAEDA J, UENO N. **Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers.** Biochem Biophys Res Commun v.232, p.153-156, 1997.

TELFER, E.E. **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.

TERMAAT MF, DEN BOER FC, BAKKER FC, PATKA P, HAARMAN HJTHM. **Bone Morphogenetic Proteins. Development and Clinical Efficacy in the Treatment of Fractures and Bone Defects.** J Bone Joint Surg Am v.87, p.1367-1378, 2005.

TILLY, J. L. **Apoptosis and ovarian function.** Reviews of Reproduction, v. 1, p. 162-172, 1996.

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, M. M.; BECKER, J. F. **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.

WANG EA, ROSEN V, D'ALESSANDRO JS, BAUDUY M, CORDES P, HARADA T, ISRAEL DI, HEWICK RM, KERNS KM, LAPAN P, LUXENBERG DH, MCQUID D, MOUTSATSOS IK, NOVE J, WOZNEY JM. **Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation.** *Proc Natl Acad Sci* v.87; p.2220-2224, 1990.

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.** *Biology of Reproduction*, 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.** *Molecular Endocrinology* 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.

A662i Araújo, Valdevane Rocha
Influência da Proteína Morfogenética Óssea-7 (BMP-7) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos / Valdevane Rocha Araújo. - Fortaleza, 2008.
75p.; il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) –
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Caprinos. 2. Folículos pré-antrais. 3. Cultivo. 4. Sobrevivência. 5.
BMP-7. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.0824

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)