

O PAPEL DAS PROTEÍNAS ÓSSEAS MORFOGENÉTICAS (BMPs) NA FUNÇÃO OVARIANA E INFERTILIDADE FEMININA

Alessandra Aparecida Vireque¹

Rosana Maria Reis²

Luciana Ochuiuto Teixeira Resende³

Elisa Melo Ferreira⁴

Rui Alberto Ferriani⁵

RESUMO

Avanços nas técnicas de reprodução assistida e o tratamento de doenças com reconhecida correlação com a infertilidade, como endometriose, ovários policísticos e falência ovariana prematura (POF) requerem melhor entendimento da fisiologia ovariana. Apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante as duas últimas décadas, o entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular ainda não foi atingido. A função ovariana é regulada pelas interações entre as gonadotrofinas, FSH e LH, e os fatores ovarianos locais, como as inibinas, activinas, proteína óssea morfogenética-15 (BMP-15) e fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), todos membros da superfamília do fator de crescimento e transformação- β (TGF- β). As BMPs estão emergindo como uma família de proteínas críticas para a fertilidade e taxa ovulatória em diversas espécies de mamíferos e são expressas em vários tipos de células no ovário. Há evidências de um sistema GDF-9-BMP-15-KL funcional, com inúmeros genes envolvidos no desenvolvimento folicular normal e infertilidade. Estudos recentes demonstram uma relação direta entre qualidade/maturação do oócito e viabilidade embrionária e enfatizam a importância das interações que ocorrem entre o oócito, as células somáticas e os hormônios endócrinos para o desenvolvimento ovariano e para a produção de oócitos com alto potencial de desenvolvimento.

Palavras-chave: oócito; células foliculares somáticas; superfamília do TGF- β ; GDF-9; BMP-15; infertilidade.

ABSTRACT

Advances in assisted reproduction techniques and the treatment of diseases with a recognized correlation with infertility, such as endometriosis, polycystic ovaries and premature ovarian failure (POF) require a better understanding of ovarian physiology. Despite the enormous amount of information produced during the last two decades, a complete understanding of the controlling mechanisms of follicular development has not yet been achieved. Ovarian function is regulated by interactions between gonadotropins, FSH and LH, and local ovarian factors such as inhibins, activins, bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9 (GDF-9),

¹ Doutorado em Ciências Médicas pela Universidade de São Paulo, Brasil (2008). Pesquisador colaborador da Universidade de São Paulo, Brasil.

² Especialização em Gestão Pública em Saúde pela Universidade Federal de Uberlândia, Brasil (2012). Relações Empresariais da Unimed do Estado de São Paulo - Federação, Brasil.

³ Mestrado em Biologia da Reprodução pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Brasil (2010). Pós graduanda da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Brasil.

⁴ Doutorado em Ciências Médicas - Biologia da Reprodução pela UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - CAMPUS RIBEIRÃO PRETO, Brasil (2015). Embriologista do PróVida Medicina Reprodutiva Ipatinga, Brasil.

⁵ Doutorado em Pós-Graduação Ginecologia e Obstetrícia pela Universidade de São Paulo Ribeirão Preto, Brasil (1988). Sócio correspondente do Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, Espanha.

all members of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily. BMPs are emerging as a family of proteins critical to fertility and ovulatory rate in several mammalian species and are expressed in several cell types in the ovary. There is evidence of a functional GDF-9-BMP-15-KL system, with numerous genes involved in normal follicular development and infertility. Recent studies demonstrate a direct relationship between oocyte quality/maturation and embryonic viability and emphasize the importance of the interactions that occur between the oocyte, somatic cells and endocrine hormones for ovarian development and for the production of oocytes with high developmental potential.

Key words: oocyte; somatic follicular cells; TGF- β superfamily; GDF-9; BMP-15; infertility.

1 INTRODUÇÃO

A progressão do folículo ovariano através dos sucessivos estádios da foliculogênese é dependente de uma efetiva via de comunicação bidirecional entre o oócito e as células foliculares somáticas e requer também sinais endócrinos, principalmente as gonadotrofinas e hormônios metabólicos, os quais atuam em receptores nos dois tipos de células e interagem com vias de sinalização autócrinas/parácrinas locais.

Vários fatores de crescimento, incluindo os membros da superfamília do fator de crescimento e transformação- β (TGF- β), são expressos pelo oócito e células foliculares em estágios específicos do desenvolvimento e funcionam como moléculas regulatórias intraovarianas envolvidas no recrutamento folicular, proliferação/atresia das células da granulosa e da teca, esteroidogênese, maturação oocitária, ovulação e luteinização (Hunter et al, 2005, Knight e Glister, 2003). O desenvolvimento folicular normal depende da coordenação entre os processos de proliferação/diferenciação das células somáticas e o crescimento/maturação do oócito; e a sinalização oócito-células da granulosa é crítica para assegurar esta coordenação, promovendo funções celulares integradas (Thomas e Vanderhyden, 2006; Buccione et al, 1990, Eppig et al, 2002). A comunicação intercelular ocorre via processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP) e mediadores parácrinos, dentre os quais se destacam o fator de células tronco (SCF), também conhecido como Kit-ligante (KL) e as BMPs, particularmente o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15 ou GDF9B) (THOMAS e VANDERHYDEN, 2006). Mutações inativadoras dos genes GDF-9 e BMP-15 estão associados à falência ovariana prematura e infertilidade em ovelhas e mulheres, indicando a participação fundamental destes fatores de crescimento na regulação da foliculogênese e ovulação (GALLOWAY et al, 2000, Di Pasquale et al, 2004). Além disso, uma alça de feedback GDF-9/BMP-15-KL têm sido descrita como um importante mecanismo de sinalização na

interface oócito-células da granulosa e de coordenação do desenvolvimento folicular (Joyce et al, 2000, Hunter et al, 2005, Otsuka e Shimasaki, 2002). Esta revisão sumariza os ligantes da superfamília do TGF- β , seus receptores e vias de sinalização e discute as funções ovarianas das BMPs secretadas pelo oócito como reguladores críticos da fertilidade.

2 A SUPERFAMÍLIA DO TGF- β

As moléculas de sinalização extracelular da superfamília do fator de crescimento e transformação- β (TGF- β) compreendem cerca de 30 proteínas estruturalmente relacionadas e funcionalmente distintas, as quais incluem três isoformas em mamíferos do TGF- β (TGF- β 1,2,3), hormônio anti-mülleriano (AMH), duas inibinas (A e B), três activinas (A, B, AB), 20 BMPs (BMP-1-BMP-20) e nove fatores de crescimento e diferenciação (GDF-1-GDF-9) (Massagué and Wotton, 2000).

Coletivamente, os ligantes da superfamília do TGF- β têm funções regulatórias em uma grande variedade de tecidos com participação bem documentada em processos como a indução do mesoderma embrionário, diferenciação do ducto genital, miogênese, formação óssea, foliculogênese ovariana e outros processos fisiológicos (Chang et al, 2002, Mazerbourg e Hsueh, 2006). Entre os fatores expressos no ovário estão incluídos GDF-9, GDF-9B (BMP-15), inibinas, activinas, TGF- β , BMPs 2, 4, 6, 7 e AMH (Knight e Glister, 2003).

3 FATORES DE CRESCIMENTO OOCITÁRIOS: AS BMPs

As proteínas ósseas morfogenéticas são citocinas multifuncionais capazes de regular a proliferação/diferenciação celular, a deposição de matriz extracelular e apoptose (Massagué et al, 2000). Entre as 20 BMPs conhecidas, oito estão implicadas na formação e/ou função das células germinativas de mamíferos e formação/função ovarianas (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-15 e GDF-9) (Dong et al, 1996, Bodensteiner et al, 1999, Erickson et al, 2003, Glister et al, 2004), sendo o GDF-9, BMP-15 e BMP-6 expressos seletivamente pelo oócito em diferentes espécies, já nos estádios iniciais da foliculogênese (Matzuk et al, 2002, Otsuka et al, 2000, Otsuka e Moor, 2001, Aaltonen et al, 1999). As BMPs são sintetizadas e secretadas como pré-propeptídeos e são proteoliticamente clivadas para formar dímeros ativados ligados por pontes dissulfeto,

sendo a maioria homodímeros. Contudo, os produtos gênicos da BMP-15 e GDF-9 podem formar heterodímeros (Mazerbourg et al, 2006).

3.1 Funções ovarianas das BMPs secretadas pelo oócito

A expressão e bioatividade dos fatores de crescimento oocitários têm sido investigadas em estudos focados, principalmente, em sistemas de cultura murinos e têm demonstrado que o oócito regula vários parâmetros da função das células foliculares *in vitro*, particularmente, estimulando a atividade mitótica e secreção de estradiol e inibindo a síntese de progesterona (Vanderhyden et al, 1993, Vanderhyden e Macdonald, 1998). Estes achados têm sido também descritos em ovários suínos, ovinos, bovinos e humanos (Quinn et, 2003, Brankin et al, 2003ab, Souza et al, 2002, Bodensteiner et al, 1999, Glistler et al, 2001, Jaatinen et al, 2002).

A deleção do gene *GDF-9* causa infertilidade com foliculogênese bloqueada no estágio primário em camundongos (Dong et al, 1996) e resulta em *downregulation* na expressão de RNAm para a activina B β , folistatina e ciclooxigenase 2 (COX-2), além de significativa *upregulation* da expressão do Kit ligante (KL) (14), desenvolvendo-se folículos com células da granulosa (CG) atípicas e sem a camada de células da teca (CT). Portanto, o GDF-9 pode se ligar a receptores nas células da granulosa e regular a expressão de vários produtos gênicos (Elvin et al, 1999). Durante a maturação terminal do folículo, o GDF-9 desempenha funções importantes para deflagrar os mecanismos associados à ovulação, como: 1) mantém a integridade estrutural do folículo pré-ovulatório, induzindo a HS2 (hialuronan syntetase 2), pentraxina 3 e suprimindo o ativador do plasminogênio uroquinase; 2) estimula a síntese de prostaglandina e progesterona; 3) suprime a luteinização precoce das CG do “cumulus” inibindo a síntese de RNAm do LHR e a expansão do cumulus (Joyce et al, 2000).

A BMP-15 estimula a proliferação celular, com efeito mitogênico FSH-independente, em culturas primárias de CG de ratos (Moore et al, 2003, Otsuka et al, 2000). Também suprime a expressão de receptores para FSH e estimula a expressão do kit ligante (Nuttink et al, 2000). Os efeitos biológicos da BMP-6 sobre as CG são distintos das outras BMPs. O BMP-6 não apresenta efeito mitogênico sobre as CG (Gilchrist et al, 2006) e inibe a produção de P4 induzida pela forskolina, a expressão do RNAm da StAR e da P450scc (Otsuka et al, 2000). O mecanismo pelo qual o BMP-6 inibe a ação do FSH envolve, provavelmente, *dow-regulation* da atividade de adenilato ciclase, distintamente do BMP-15, o qual inibe a expressão basal dos receptores de FSH (FSH-R).

3.1.1 A alça regulatória oócito-CG durante a foliculogênese

Embora a existência de um sistema de feedback parácrino regulatório entre o oócito e as células foliculares somáticas tenha sido postulado, não há ainda evidências definitivas dos mecanismos que operam neste sistema de comunicação, sobretudo em ruminantes e primatas. Estudos genéticos, em ratos e camundongos, têm identificado proteínas específicas participantes desta alça regulatória, como: 1) os fatores oocitários GDF-9 e BMP-15; 2) receptor tirosina quinase (c-Kit; Kit), expresso na superfície do oócito e 3) KIT ligante (KL), derivado das CG (Thomas e Vanderhyden, 2006).

As vias de sinalização do KL, BMP-15 e GDF-9 interagem e se modulam reciprocamente (Driancourt et al, 2000). Em animais nocaute, a indução de alterações na expressão gênica do GDF-9 e/ou KIT correlaciona-se com quadros de infertilidade decorrentes de bloqueio do desenvolvimento folicular no estágio pré-antral. O ovário nocauteado para o locus gênico *gdf9* apresenta defeitos na proliferação e diferenciação das CG, enquanto alterações na expressão do KIT resultam em anomalias oocitárias. A ausência do GDF-9 está implicada no aumento da expressão do KIT pelas CG e outras anormalidades das células foliculares associadas ao crescimento oocitário precoce e outros comprometimentos, levando à falência do oócito (Elvin et al, 2000). Experimentos com GDF-9 recombinante e com oócitos murinos indicam que o GDF-9 suprime a expressão do RNAm de isoformas do KL: KL-1 e KL-2 em CG de folículos pré-antrais e em CG murais *in vitro*, embora não esteja claro se o GDF-9 media as ações do oócito em todos os estágios de seu desenvolvimento (Joyce et al, 2000). Inversamente, a BMP-15 é um importante estimulador da expressão do KL (39). O BMP-15 estimula a expressão de KL nas CG, enquanto o KL inibe a expressão do BMP-15 no oócito, formando, assim, uma alça de feedback negativo dependente do sistema de comunicação oócito-CG (Shimasaki et al, 2002).

No início do desenvolvimento folicular, as interações Kit/KL controlam o crescimento do oócito e a diferenciação das CT, além de proteger os folículos pré-antrais de apoptose (12). A formação da cavidade antral também requer um sistema Kit/KL funcional. Em folículos em crescimento, o sistema Kit/KL modula a maturação citoplasmática do oócito e maximiza a produção de andrógenos tecais (Driancourt et al, 2000). Concentrações aumentadas do KL no fluido folicular de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* estão associadas a maiores taxas de gestação (Smikle et al, 1998). A formação do folículo dominante é um processo que envolve crescimento, proliferação

celular e citodiferenciação (2 Erickson). Na fase pré-antral do desenvolvimento folicular, predominam o crescimento oocitário e a proliferação celular somática. Enquanto na fase antral/pré-ovulatória, ocorre a citodiferenciação dos compartimentos germinativo e somático. De acordo com hipótese corrente, o fator estimulatório secretado por oócitos em crescimento seria o BMP-15, enquanto oócitos que completaram seu ciclo de crescimento secretam um fator inibitório da expressão do KL, o GDF-9. Alguns autores sugerem a existência de um fino balanço entre os fatores promotores e supressores da expressão de RNAm do KL nas CG (24) e o papel potencial desta alça de feedback regulatória parece ser o controle do crescimento oocitário, já que há evidências *in vivo* e *in vitro* que o KL estimula este processo (Joyce et al, 2002, Thomas e Vanderhyden, 2006).

3.2 Receptores e sinalização intracelular das BMPs

Os membros da superfamília do TGF- β se ligam aos receptores de membrana serina/treonina quinase e ativam os fatores de transcrição Smad (Massagué, 1998, Kawabata et al, 1998). No genoma humano, a família de receptores serina/treonina quinase compreende 12 membros, sendo 5 receptores tipo II: o receptor BMP tipo II (BMPRII), o receptor do hormônio anti-mülleriano tipo II (AMHRII), o receptor TGF- β tipo II e os receptores de activina tipo II (ActRIIA e ActRIIB). Há também sete receptores tipo I referidos como receptores de activina quinase-like (ALKs) (tem Dijke et al, 1993). Ambos os tipos de receptores consistem de aproximadamente 500 aminoácidos e apresentam um domínio extracelular amino-terminal com 10 ou mais cisteínas, uma região transmembrana e um domínio serina/treonina quinase carboxi-terminal. Os ligantes ativam duas vias principais de sinalização intracelular caracterizadas pela ativação de dois grupos diferentes de proteínas Smad: Smad 1/5/8 e Smad 2/3 (Figura 1) (Nakao et al, 1997, Liu et al, 1995).

As BMPs, como os outros ligantes da família do TGF- β , atuam nos receptores serina/treonina quinase (Massagué e Chen, 2000) e a transdução dos sinais requer a formação de um complexo hetero-oligomérico com receptores de BMPs (BMPRs) do tipo II e do tipo IA ou IB (AKLs) (Massagué e Chen, 2000, Miyazono et al, 2001). O BMPR-II possui atividade de autofosforilação e é responsável pela ativação do receptor do tipo I, uma vez que o complexo tenha sido formado. Após a ativação do receptor, uma cascata de sinalização é iniciada e envolve a fosforilação, heterodimerização e migração das proteínas Smad para o núcleo (Miyazono et al, 2001) e os complexos Smad ativados

translocados ao núcleo, juntamente com outros co-fatores nucleares, regulam a transcrição dos genes alvo (Mazerbourg e Hsueh, 2006) (Figura 1). A interação fatores de transcrição-Smad determina a resposta precisa ao ligante em diferentes tipos de células e em cooperação com outras vias de sinalização (Shi e Massagué, 2003). O GDF-9 interage com os receptores BMPRII e ALK5 e ativa a via Smad 2/3, enquanto a BMP-15 ativa a via Smad 1/5/8 através da interação com os receptores BMPRII e ALK6, como observado em células da granulosa em ratas (Moore et al, 2003). A ativação de vias de sinalização distintas pelos homodímeros do GDF-9 e BMP-15 pode estar associada às funções específicas destas BMPs no desenvolvimento folicular. Contudo, o GDF-9 e BMP-15 podem formar homo ou heterodímeros (Vitt et al, 2002, McPherron e Lee, 1993) e os últimos poderiam ativar, como o GDF-9, um híbrido das duas vias de sinalização (Gilchrist et al, 2006).

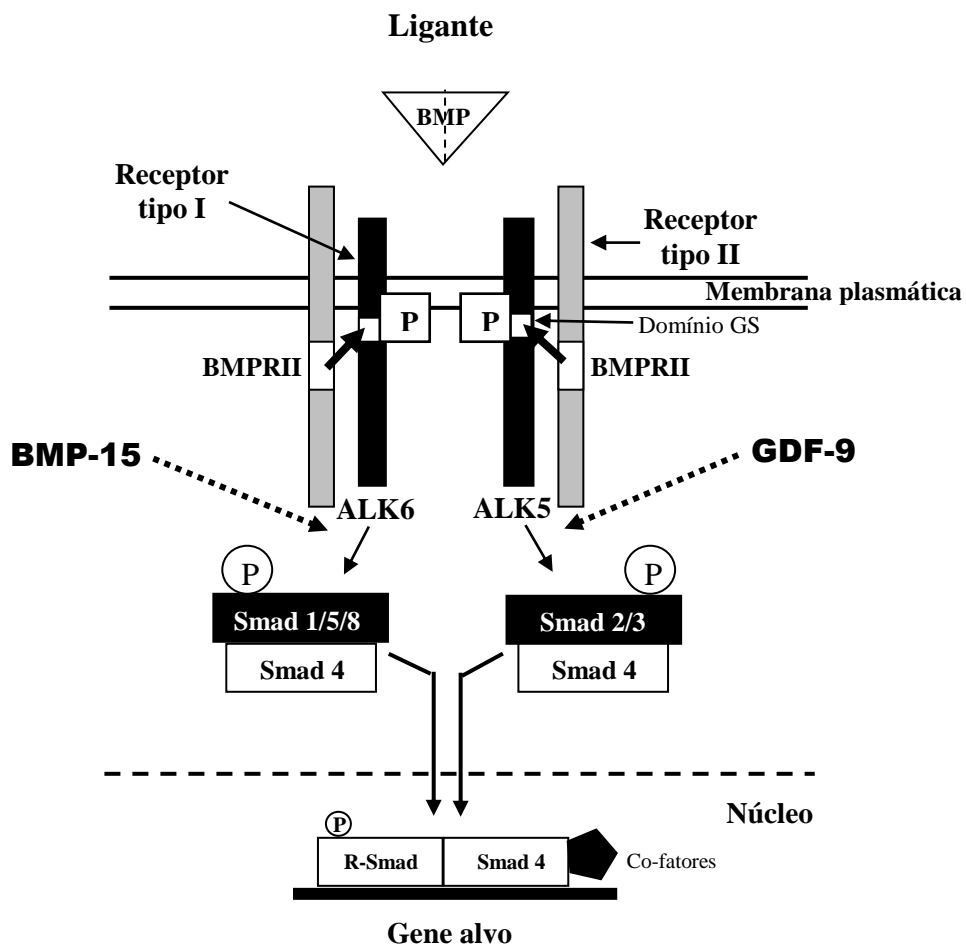


Figura 1. Receptores e vias de sinalização da BMP-15 e do GDF-9. Os dímeros do GDF-9 ou BMP-15 se ligam aos receptores serina-treonina quinase tipo I e tipo II específicos e a formação do tetrâmero (2 receptores tipo I e 2 receptores tipo II para cada ligante) permite a fosforilação do receptor tipo I pelo receptor tipo II no domínio glicina-serina

(GS), resultando na formação do complexo de transdução do sinal. Os receptores tipo I ALK5 e ALK6 reconhecem e fosforilam as R-Smads 2/3 e 1/5/8, respectivamente. As R-Smads fosforiladas formam complexos com a Smad-4 (Co-Smads) e são translocados ao núcleo onde interagem com os motifs específicos do DNA. A ligação efetiva ao gene alvo é modulada por vários co-fatores nucleares, co-ativadores ou co-repressores de transcrição.

Os três tipos de receptores das BMPs são expressos nos diferentes tipos de células ovarianas, incluindo o oócito, CG, CT, células epiteliais e endoteliais em ovários de ratas, porcas, ovelhas e na mulher (Ericson e Shimazaki, 2003, Quinn et al, 2004, Wilson et al, 2001, Souza et al, 2003, Kaivo-Oja et al, 2005), embora haja diferenças sutis nos padrões de expressão entre espécies. Os BMPRs também foram observados no ovário fetal suíno, indicando o envolvimento das BMPs na formação dos folículos ovarianos (Quinn et al, 2004). A presença de receptores para as BMPs e a habilidade destes fatores em modular a esteroidogênese são indicativos de um sistema BMP funcional intraovariano.

3.3 Regulação da expressão das BMPs no ovário

Ainda não está claro qual é o fator responsável pela ativação ou regulação da expressão das BMPs no ovário. Dois fatores apontados como reguladores da atividade das BMPs são a folistatina e o kit ligante (KL). A folistatina é capaz de se ligar, especificamente, às BMPs e atenuar alterações induzidas por estas proteínas em CG bovinas e de ratas (Glister et al, 2004, Otsuka et al, 2001). Uma suposta alça de feedback tem sido descrita entre os fatores expressos pelo oócito, BMP-15 e GDF-9 e o KL expresso pelas CG, onde o BMP-15 e GDF-9 estimulam e inibem, respectivamente, a expressão do KL e o KL inibe a expressão do BMP-15 (Joyce et al, 2000, Otsuka e Shimazaki, 2002). Dessa forma, a folistatina e o kit ligante constituiriam dois mecanismos regulatórios potenciais para o controle da atividade das BMPs dentro do ovário, no entanto, esta e outras interações ainda precisam ser esclarecidas.

4 BMPs E INFERTILIDADE

O recente interesse pelas BMPs advém de observações que correlacionam mutações genéticas induzidas ou espontâneas em membros da família das BMPs e

comprometimentos do desenvolvimento ovariano e ovulação (Dong et al, 1996, Galloway et al, 2000, Kovanci et al, 2007, Takebayashi et al, 2000). Mutações espontâneas nos genes BMP-15 (*FecX*) ovino e murino e no gene GDF-9 (*FecG*) ovino podem alterar drasticamente a fertilidade e taxa ovulatória nestas espécies de mamíferos. A deleção dos genes BMP-15 ou GDF-9 (ovelhas, camundongos) ou a imunização contra a BMP-15 (ovelhas) resulta em animais inférteis (Juengel et al, 2002, Hanrahan et al, 2004). A infertilidade é decorrente do desenvolvimento folicular retardado e o exame histológico mostra oócitos grandes, proliferação ausente ou anormal da granulosa e falhas no recrutamento da teca (camundongos GDF-9-nocautes) (Dong et al, 1996, Braw-Tal et al, 1993).

As ovelhas Inverdale e Hanna, por apresentarem mutações inativadoras da BMP-15, constituem um modelo interessante para a compreensão das funções desta proteína no controle da foliculogênese. A mutação em homozigose (*FecX^l/FecX^l*) causa infertilidade com bloqueio da foliculogênese no estágio primário (Braw-Tal et al, 1993), enquanto em heterozigose (*FecX^l/FecX⁺*) há aumento na taxa ovulatória e múltiplos nascimentos (Galloway et al, 2000, Montgomery et al, 1992). Da mesma forma, mutações espontâneas no gene GDF-9 em ovelhas Belclare e Cambridge ocasionam aumento dose-dependente nas taxas ovulatórias (Hanrahan et al, 2004). Na raça Booroola, mutações espontâneas inativadoras de genes que codificam os receptores das BMPs, como o BMPRII (*FecB*), também ocasionam alterações similares na taxa ovulatória (Wilson et al, 2001, Souza et al, 2001). Foi sugerido que a redução da disponibilidade de BMP-15 em ovelhas heterozigotas estimularia o desenvolvimento folicular por aumentar a sensibilidade ao FSH, já que estudos *in vitro* indicam que a BMP-15 inibe a expressão de receptores para FSH (Otsuka et al, 2001). De fato, as características de desenvolvimento folicular precoce consistem em oócitos maiores e células da granulosa mais responsivas ao FSH e com menor atividade proliferativa que CG normais (Wilson et al, 2001, Montgomery et al, 1992). Neste caso, o ovário produz grande número de folículos menores e mais estrogênicos que escapam ao controle endócrino e a maioria destes folículos progride até a ovulação.

No ovário humano, alguns autores têm investigado a correlação entre mutações nos genes *gdf-9* e *bmp-15* e patologias como a falência ovariana prematura e SOMP (Chand et al, 2006, Kovanci et al, 2007, Takebayashi et al, 2000). Análises mutacionais destes genes em grupos de mulheres com diagnóstico clínico de POF, ainda não são conclusivos, mas indicam que esta é uma explicação plausível para a POF. Contudo, os resultados são discordantes em diferentes populações e etnias e alguns autores sugerem

que as mutações no gene *gdf-9* associadas à POF apresentam um espectro que varia com a população, mais do que uma única mutação comum a todas as populações (Dixit et al, 2005).

Tais observações ilustram a importância da BMP-15 como regulador da fertilidade e indicam que as BMPs secretadas pelo oócito são o ápice dos mecanismos regulatórios associados à foliculogênese. No entanto, a fertilidade e o desenvolvimento de folículos e oócitos saudáveis são dependentes de vários fatores parácrinos e endócrinos em adição às BMPs. O sistema IGF/IGFBPs, os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), fator de crescimento epidérmico (EGF)/TGF- α , fatores de crescimento endoteliais (VEGFs), interleucinas e membros da superfamília do TGF- β , como as ativinas, folistatinas, inibinas e hormônio anti-mülleriano (AMH) figuram entre vários outros peptídeos intra-ovarianos envolvidos no controle da foliculogênese.

5 CONCLUSÕES

As consequências severas de mutações e deleções nos genes *gdf9* e *bmp15* no número de folículos dominantes e taxa ovulatória em camundongos e ovelhas demonstram a importância fundamental destas proteínas secretadas pelo oócito na função ovariana. No entanto, há poucas informações acerca das ações destes fatores na infertilidade humana. Considerando o impacto do GDF-9 e BMP-15 na reprodução, em modelos animais, torna-se evidente que o sistema GDF-9/BMP-15 constitui um foco/abordagem importante para o tratamento da mulher infértil e estudos para definir o envolvimento preciso destes fatores na fisiologia/fisiopatologia ovariana humana são necessários para os avanços da ciência básica e a aplicação potencial dos conhecimentos obtidos em biotecnologias clínicas envolvendo o sistema BMP ovariano.

REFERÊNCIAS

Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(8):2744-2750.

Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. Molecular cloning of the ovine gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 1999;60:381-386.

Brankin V, Quinn RL, McGarr C, Webb R, Hunter MG. BMPs 2, 6 e 15 are regulators of porcine granulosa cell function in vitro. *Reproduction* 2003;AbsSer 31:44.

Brankin V, Mitchell MRP, Webb B, Hunter MG. Paracrine effects of oocyte secreted factors and stem cell factor on porcine granulosa and theca cells in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1:55. <http://www.rbej.com/content/1/1/55> (online published)

Braw-Tal R, McNatty KP, Smith P, Heath DA, Hudson NL, Phillips DJ, et al. Ovaries of ewes homozygous for the X-linked Inverdale gene (*FecX¹*) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. *Biol Reprod* 1993;49:895-907.

Chand, AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN. Mutational analysis of BMP-15 and GDF-9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2006;86:1009-1012.

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

Dixit H, Rao LK Padmalatha V, Hanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, et al. Mutational screening of the the coding region of growth differentiation factor-9 gene in Indian women with ovarian failure. *Menopause* 2005;12:749-754.

Dong JW, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu NF, Matzuk, MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;383:531-535.

Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of kit and cloning kit in ovarian function. *Rev Reprod* 2000;5:143-52.

Eppig, JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002;99:2890.

Erickson GF, Shimasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:9.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*. 2000; 25:279-83.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic RA, Hickey TE, Ritvos O, Mottershead DG. Molecular basis of oocyte-paracrine signaling that promotes granulosa cell proliferation. *Journal of Cell Science* 2006;119:3811-3821.

Glister C, Tanneta DS, Groome NP, Knight PG. Interaction between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 2001;65:1020-1028.

Glister C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -7, and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 2004;127:239-254.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP-15 are associated with both

increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). Biol Reprod 2004;70:900-909.

Hunter MG, Brankin V, Quinn RL, Ferguson EM, Edwards S, Ashworth CJ. Oocyte-somatic cell-endocrine interactions in pigs. Dom Anim Endocrinol 2005;29:371-384.

Jaatinen R, Bondestam J, Raivio T, Hilden K, Dunkel L, Groome N, Rivos O. Activation of bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin betasubunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:1254-1261.

Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of cloning kit messenger ribonucleic acid expression in mouse follicles. Biol Reprod 2000;63:1669-75.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. Biol Reprod 2002;67:1777-1789.

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

Knight PG, Glister C. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. Anim Reprod Sci 2003;78:165-183.

Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA. Growth differentiation factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. Fertil Steril 2007;87:143-146.

Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA. Growth differentiation factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. Fertil Steril 2007;87(1):143-146.

Liu F, Ventura F, Doody J, Massagué J. Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor ALK-1. Mol Cell Biol 1995;15:3479-3486.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 1998;67:753-791.

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev 2000;14:627-644.

Massagué J, Wotton D. transcriptional control by the Smad signaling system. Embo J 2000;19:1745-1754.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. Science 2002;296:2178-2179.

Mazerbourg S, Hsueh AJ. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signaling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. Human Reproduction Update 2006;12(4):373-383.

McPherron AC, Lee SJ. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 1993;268:3444-3449.

Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 2001;187:265-276.

Montgomery GW, McNatty KP, Davis GH. Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocr Rev* 1992;13:309-328.

Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 2003;278:304-10.

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

Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K. TGF-beta receptor-mediated signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997;16:5353-5362.

Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Ericson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000;275:(39)523-28.

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

Otsuka F, Yamamoto S, Ericson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem* 2001;276:11387-92.

Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem* 2001;276:(32)889-95.

Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:(80)60-65.

Quinn RL, Brankin V, McGarr C, Weeb R, Hunter MG. BMPs-2, -6 and -15 are regulators of porcine granulosa cell function in vitro. *Reproduction* 2003;Abs Ser 31:44.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.

Shimazaki S, Zachow RJ, Li DM, Kim H, Iemura S, Ueno N, et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7282-7287.

Smikle CB, Dandekar PV, Schriock ED, Givens CR. Elevated ovarian follicular fluid stem cell factor concentrations are associated with improved pregnancy rates in in-vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 1998;69:70-72.

Souza CJH, McDougall C, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMP1B) gene. *J Endocrinol* 2001;169:R1-6.

Souza CJH, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* 2002;123:363-369.

Takebayashi K, Takakura K, Wang H, Kimura F, Kasahara K, Noda Y. Mutation analysis of growth differentiation-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000;74(5):976-979.

Ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schltz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 1993;8:2879-2887.

Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod* 2001;64:1225-1235.

Vanderhyden BC, Macdonald, EA. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. *Biol Reprod* 1998;59:1296-301.

Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993;133(1):423-426.

Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod* 2002;67:473-480.