

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL - CURSO DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGB

JOSÉ JACKSON DO NASCIMENTO COSTA

**ESTABILIDADE DE GENES DE REFERÊNCIA E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS
MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs), RECEPTORES DE BMP E MENSAGEIROS
INTRACELULARES (SMADs) EM FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS**

SOBRAL - CEARÁ

2011

JOSÉ JACKSON DO NASCIMENTO COSTA

**ESTABILIDADE DE GENES DE REFERÊNCIA E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS
MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs), RECEPTORES DE BMP E MENSAGEIROS
INTRACELULARES (SMADs) EM FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Macromoléculas

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL - CEARÁ

2011

JOSÉ JACKSON DO NASCIMENTO COSTA

ESTABILIDADE DE GENES DE REFERÊNCIA E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs), RECEPTORES DE BMP E MENSAGEIROS INTRACELULARES (SMADs) EM FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração em Macromoléculas.

Aprovada em: ___/___/___.

Conceito obtido: _____

Nota obtida: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva - (Orientador)
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

Prof. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues
(Universidade Estadual do Ceará - UECE)

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha
(Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA)

*À DEUS, pela minha existência,
pela força, coragem e determinação
que me foi dada para alcançar mais
esse objetivo, porque nada nos é
possível se não for de Sua vontade,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor e pela sua infinita misericórdia manifestados a cada dia em minha vida. Senhor, a minha confiança descansa em tuas mãos. Sempre espero e confio em ti. Obrigado por mais essa vitória.

Aos meus pais José Ponte Costa e Maria de Fátima do Nascimento, por terem me dado a vida e por todo amor e dedicação fundamentais em todos os momentos da minha vida.

À minha avó Maria da Conceição Melo do Nascimento e ao meu avô Pedro Manoel do Nascimento, por todo o amor e carinho dedicados a mim, vocês são essenciais para a minha vida.

À minha namorada Amélia Araújo, agradeço pelo amor, amizade, companheirismo, apoio nos momentos mais difíceis e pela compreensão que me deram suporte na trajetória final deste trabalho....Sou muito mais feliz com você. Que o Senhor continue nos abençoando cada dia mais. Não posso esquecer de agradecer à toda família Araújo, em especial a sobrinha Júlia Araújo, a quem gosto tanto. O meu mais sincero obrigado!!!

Aos meus irmãos Janilson Costa e sua esposa Cristiane Santos Costa, Jailson Costa e Jamile Costa, com os quais dividi momentos de alegrias e tristezas, e que sempre estarão me incentivando e torcendo pelo meu sucesso. De forma especial, agradeço à minha sobrinha, Ana Clara Costa, uma das maiores alegrias da minha vida, você é muito especial.

A todos os meus tios(as) e primos(as), que longe ou perto sempre me ajudaram, torcem por mim e sempre estarão no meu coração.

Ao orientador Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pela orientação deste trabalho, paciência, pela dedicação dispensada, companheirismo, confiança e profissionalismo demonstrados no decorrer de nossa breve convivência. Agradeço pela contribuição decisiva na minha formação e pelo muito que aprendi.

À amiga e irmã Emanuela Rebouças, que vem dividindo comigo os meus momentos de chatices (“abuso”), angústias, mas também muitas e muitas alegrias, pois como diz a música “amigo é muito mais do que alguém pra conversar, alguém pra abraçar, amigo é uma bênção que vem do coração de Deus, pra gente cuidar”. É assim que você é pra mim. Obrigado por ser minha amiga! Ah, no final sempre dá tudo certo!

À amiga e irmã Tânia Lopes, obrigado por me agüentar todos esses anos, obrigado pela amizade, carinho e momentos de diversão. É bom ter o privilégio da sua presença em minha vida, vou te levar sempre comigo no coração. Sou eternamente grato a Deus por nossa amizade, você é muito especial.

À amiga Cintia Camurça agradeço de forma especial, pelo convívio, confiança, amizade e companheirismo durante todos esses anos. Que Deus continue abençoando nossa amizade. Obrigado pelos ensinamentos, pela dedicação durante a execução dos experimentos e pelo exemplo de competência.

À querida amiga Juliane Passos, agradeço pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo desde o início e por me tratar sempre com muito carinho como se eu fosse um irmão. Obrigado pelo fundamental apoio e colaboração durante a execução deste experimento.

Ao amigo Anderson Weiny, agradeço pela amizade e pelo companheirismo, tanto nos momentos de trabalho, quanto nos momentos de descontração. Obrigado pelo acolhimento, pela disponibilidade e auxílio nas coletas e isolamentos. Você é essencial para o nosso grupo e pela alegria e pelas habilidades.

À amiga Gisvani Lopes agradeço por ter tornado o dia a dia muito mais divertido e agradável, sempre trazendo alegria e descontração durante a execução de todos os experimentos.

Às amigas Danielle Val e Moêmia Portela, muito obrigado pela amizade, conversas, incentivo, carinho e momentos agradáveis. Sem as risadas de vocês tudo teria sido mais difícil.

Aos queridos amigos integrantes do grupo de pesquisa de Reprodução e Cultura de Células: Isana Mara, Rodrigo Rossi, Regislane Ribeiro, Glaucinete Borges, Katianne Freitas, Diego Tavares e aos recém chegados Renato Passos, Taiã Gomes e Ana Lídia Madeira. Obrigado pela ajuda, convivência, conhecimentos trocados, brincadeiras e pela disponibilidade de coletar os ovários diversas vezes, mesmo que durante a madrugada... Muito obrigado por tudo! Vocês são pessoas especiais que carregarei para sempre no coração.

Ao prof. Dr. Rodrigo Maranguape por ter me aceito como aprendiz e pelo incentivo dado aos meus primeiros passos na pesquisa durante minha iniciação científica e a toda equipe do Laboratório de Genética Molecular do NUBIS, de forma especial a Auxiliadora Oliveira, João Garcia, Daniel Brito, Gleiciane Martins, Nágila Matos, Francisco de Sousa, Tatiana Farias, Nyanne Hardy, Raulzito Fernandes, Cleane Moreira, Vitória Soares, Aurilene Gomes, Jedson Aragão e Áurea Morgana, pela convivência durante todos esses anos, desde a graduação.

Aos colegas de Pós-Graduação: Eliane Pereira, Monalysa Neves, Luiz Neto, Ricardo Basto, Francisca Alves, Eveline Matias e Márcia Marinho, companheiros das madrugadas de preparação dos seminários e caminhadas para a UFC, obrigado pela amizade e pelos bons momentos vividos juntos.

Aos amigos José Guedes Neto, Raquel Farias, Ronaldo Dias, Apoliana Rodrigues, Gerusa Brito, Isaac Fernandes, Fauzer Deison, Mayrla Silva, Carla Lima, Cristina Lima, Eleones Filho, Eliane Rebouças e toda a família Rebouças, Jordânia Marques, que fazem parte da minha vida pessoal e acadêmica, dividindo momentos de tristezas, mas principalmente momentos de alegria.

À banca pela participação, trazendo sua colaboração para o aprimoramento e enriquecimento desta dissertação.

Agradeço a todos os Mestres, independentemente em que fase da vida eles tenham contribuído com minha formação, mas que por serem Professores merecem todo o meu respeito e minha admiração. Pois é uma das mais bonitas incumbências.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Vicente Pinto e as secretárias Najda Alves e Edilda Albuquerque.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, com os quais tive a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina de Sobral pela convivência, atenção e disponibilidade durante todos esses anos.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela concessão da bolsa de estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do nosso projeto.

À todos que de alguma forma me deram força e incentivo na realização do meu mestrado, seja profissionalmente ou sentimentalmente e por participarem da minha vida.

À todos vocês, de coração, o meu **MUITO OBRIGADO!!!**

“Porquanto, ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; Todavia eu me alegrarei no Senhor, exultarei no Deus da minha salvação. O Senhor é minha força e me fará andar sobre as minhas alturas.”

(Habacuque, 3:17-19)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ActR	Receptor para ativina
ActR- IA	Receptor para ativina tipo I-A
ActR-IB	Receptor para ativina tipo I-B
ActR- II	Receptor para ativina tipo II
ActR-IIB	Receptor para ativina II-B
ALK	do inglês, activin receptor-like kinase
ALK-2	do inglês, activin receptor-like kinase type 2
ALK-3	do inglês, activin receptor-like kinase type 3
ALK-4	do inglês, activin receptor-like kinase type 4
ALK-6	do inglês, activin receptor-like kinase type 6
ALK-8	do inglês, activin receptor-like kinase type 8
AMPc	AMP cíclico
as	Anti senso
BL-3	Células linfóides de bovinos
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMPR	Receptor para proteína morfogenética óssea
BMPR-IA	Receptor para proteína morfogenética óssea tipo I-A
BMPR-IB	Receptor para proteína morfogenética óssea tipo I-B
BMPR-II	Receptor para proteína morfogenética óssea tipo II
BMP-2	Proteína morfogenética óssea 2
BMP-3	Proteína morfogenética óssea 3
BMP-3b	Proteína morfogenética óssea 3b
BMP-4	Proteína morfogenética óssea 4
BMP-6	Proteína morfogenética óssea 6
BMP-7	Proteína morfogenética óssea 7
BMP-15	Proteína morfogenética óssea 15
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus Celsius
cAMP	AMP cíclico
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
CG	Células da granulose
CGPs	Células germinativas primordiais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO	Co-reguladores
COCs	Complexos cúmulus-oócitos
CO ₂	Gás carbônico
Cp	<i>Crossing point</i>
Ct	<i>Ciclo threshold</i>
CYP11A1	Colesterol desmolase (enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol)
CYP17A1	Enzima P450 17 α hidroxilase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DPC4	Gene deletado em carcinoma pancreático <i>locus 4</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
E2	Estradiol
F	Fluoróforo

FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação-9
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H	Hora
hESCS	Células-tronco embrionárias de humanos
HSD3B1	Enzima 3 β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1
ITS	Insulina-transferrina-selênio
kDa	KiloDalton
KL	Kit ligand
LH	Hormônio luteinizante
Lys	Lisina
M	Molar
M	Valor médio de estabilidade de expressão dos <i>housekeepings</i>
MAD	Proteína <i>Mothers Against Decapentaplegic</i> identificada em <i>Drosophila melanogaster</i>
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógenos
MAPK-p38	Proteína kinase ativada por mitógenos p38
MEM	Meio essencial mínimo
MEM ⁺	Meio essencial mínimo suplementado
Mg ⁺²	Magnésio
Mg	Miligrama
min	Minuto
MIS	Substância de inibição Mülleriana
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NF	Fator de normalização
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PAPP-A	Proteína Plasmática Associada à Gestação
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGK	Fosfoglicerato quinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIV	Produção <i>in vitro</i>
P4	Progesterona
P450sc	Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
P<0.05	Probabilidade menor do que 5%
P>0.05	Probabilidade maior do que 5%
Q	Quencher
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo real
r	Coeficiente de correlação
RGM	Proteínas de orientação repulsiva molecular
RGM-a	Proteínas de orientação repulsiva molecular a
RGM-b	Proteínas de orientação repulsiva molecular b

RGM-c	Proteínas de orientação repulsiva molecular c
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	Ácido ribonucléico ribossomal
RNA _r 5,8S	Ácido ribonucléico ribossomal 5,8S
RNA _r 18S	Ácido ribonucléico ribossomal 18S
RNA _r 28S	Ácido ribonucléico ribossomal 28S
RPL	Proteína ribossomal
RPLP0	Proteína ribossomal P0
RPL-4	Proteína ribossomal 4
RPL-15	Proteína ribossomal 15
RPL-19	Proteína ribossomal 19
R-SMADs	Regulamentada SMAD receptor
RT-PCR	Transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase
s	Senso
sec	Segundo
SMA	Homólogo à MAD encontrados em <i>Caenorhabditis elegans</i>
SMADs	Mensageiros intracelulares da via de sinalização das BMPs
SMAD-1	Mensageiro intracelular do tipo 1
SMAD-4	Mensageiro intracelular do tipo 4
SMAD-5	Mensageiro intracelular do tipo 5
SMAD-8	Mensageiro intracelular do tipo 8
StAR	Proteína reguladora da estereidogênese aguda
TF	Fatores de transcrição
TGF-β	Superfamília de fatores de crescimento transformante beta
TGF-β1	Superfamília de fatores de crescimento transformante beta 1
TGF-β2	Superfamília de fatores de crescimento transformante beta 2
TGF-β3	Superfamília de fatores de crescimento transformante beta 3
UBQ	Ubiquitina
V	Média de variação dos pares de primers
XIAP	Proteína inibidora da apoptose
~	Aproximadamente
>	Maior que
<	Menor que
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Porcentagem

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar a estabilidade de genes de referência e a expressão das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP-2, 4, 6, 7 e 15), seus receptores (BMPR-IA, IB e II) e seus mensageiros intracelulares (SMADs-1, 5 e 8) em folículos caprinos antes e após cultivo por 18 dias. Para avaliar a estabilidade dos genes de referência e o nível de expressão das BMPs, receptores e SMADs, folículos com aproximadamente 0,2, 0,5 e 1 mm foram isolados mecanicamente de ovários caprinos. Além disso, folículos com aproximadamente 0,2 mm foram isolados e cultivados por 18 dias em meio de cultura suplementado com FSH. Após a extração do RNA total e síntese de cDNA, foi realizada a quantificação do RNAm, por PCR em tempo real, utilizando-se *primers* específicos para genes de referência (β -actina, PGK, GAPDH, β -tubulina, UBQ, RPL-19, rRNA18S), e para as BMPs (2, 4, 6, 7 e 15) receptores de BMPs (BMPR-IA, IB e II) e SMADs (1, 5 e 8). Os resultados mostraram que β -tubulina e PGK são os genes de referência mais estáveis em folículos frescos pré-antrais e antrais caprinos. Os RNAs mensageiros para as BMPs (2, 4, 6, 7 e 15), seus receptores (BMPR-IA, IB e II) e SMADs (1, 5 e 8) são expressos em diferentes níveis em folículos pré-antrais e antrais caprinos, sendo que a expressão do RNAm para BMP-4, BMP-6 e BMP-7 em folículos de 1 mm são significativamente maiores do que em folículos de 0,2 e 0,5 mm. Entretanto, os níveis de RNAm para BMP-2 foi reduzido em folículos de 1 mm, já os níveis de BMP-15 não diferiram entre as categorias foliculares analisadas. Os níveis de RNAm para BMPR-IB foram maiores em folículos de 0,2 mm do que em folículos de 0,5 e 1 mm, enquanto que o RNAm para BMPR-II foi significativamente maior em folículos de 0,5 mm do que em folículos de 0,2 e 1 mm. Por outro lado, níveis de RNAm para BMPR-IA não diferiram entre folículos analisados. Os níveis de RNAm para SMAD-5 foram significativamente maiores em folículos de 0,2 mm do que em folículos de 0,5 e 1 mm. Contudo, folículos de 0,5 mm mostraram níveis maiores de RNAm para SMAD-8 do que folículos de 0,2 e 1 mm. Os níveis de RNAm para SMAD-1 não diferiram entre os folículos. Após as comparações dentro de cada categoria folicular, BMP-15 foi mais expressa do que BMP-7 em folículos de 0,2 e 0,5 mm. Em folículos de 0,5 mm a expressão do BMPR-IB foi maior do que BMPR-II. Em todas as três categorias foliculares estudadas, a expressão da SMAD-5 foi superior a SMAD-8. Após o cultivo, os folículos apresentaram redução dos níveis de RNAm para BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPR-IA e SMAD-5. Em conclusão, β -tubulina e PGK são os dois genes *housekeeping* mais estáveis para folículos frescos caprinos com 0,2, 0,5 e 1 mm de diâmetro. BMPs, seus receptores e SMADs apresentam padrões de expressão específicos em cada categoria folicular estudada. No entanto, em folículos cultivados há uma variação na expressão dos componentes do sistema BMP, diferindo da expressão *in vivo* de folículos com o mesmo tamanho.

Palavras-chave: caprinos, folículos, ovário, genes de referência, RNAm, BMPs

ABSTRACT

The aims this study to evaluate the stability of reference genes and the expression of bone morphogenetic protein (BMP-2, 4, 6, 7 and 15), their receptors (BMPR-IA, IB and II) and intracellular messengers (SMADs- 1, 5 and 8) in goat follicles before and after culture for 18 days. To evaluate the stability of reference genes and the expression of BMPs, receptors and SMADs, follicles of approximately 0.2, 0.5 and 1 mm were mechanically isolated from goats ovaries. In addition, approximately 0.2 mm follicles were isolated and cultured for 18 days in culture medium supplemented with FSH. Both fresh and cultured follicles were subjected to total RNA extraction and synthesis of cDNA, the quantification of mRNA was carried out by real-time PCR using specific primers for genes of reference (GAPDH, β -tubulin, β -actin, PGK, UBQ, RPL - 19, rRNA18S) and BMPs (2, 4, 6, 7 and 15) receptors of BMPs (BMPR-IA, IB and II) and SMADs (1, 5 and 8). Results showed that β -tubulin and PGK are the most stable reference genes in goats preantral and antral follicles. The messengers RNA for BMP (2, 4, 6, 7 and 15), their receptors (BMPR-IA, IB and II) and Smads (1, 5 and 8) are expressed at different levels in preantral and antral goats, and mRNA expression for BMP-4, BMP-6 and BMP-7 in 1-mm follicles are significantly higher than in follicles of 0.2 and 0.5 mm. However, the levels of mRNA for BMP-2 were reduced in follicles 1 mm, as BMP-15 did not differ between follicular categories. The levels of mRNA for BMPR-IB were higher in follicles of 0.2 mm than in follicles of 0.5 and 1 mm, whereas the mRNA for BMPR-II was significantly higher in follicles than 0.5 mm in follicles of 0.2 to 1 mm. Moreover, mRNA levels for BMPR-1A did not differ between follicles examined. The levels of mRNA for SMAD-5 were significantly higher in 0.2 mm follicles than in follicles of 0.5 and 1 mm. However, follicles of 0.5 mm showed higher levels of mRNA for SMAD-8 than follicles 0.2 and 1 mm. The levels of mRNA for SMAD-1 did not differ between follicles. After the comparisons within each category follicle, BMP-15 expression was higher than BMP-7 in follicles between 0.2 and 0.5 mm. Follicles 0.5 mm in the expression of BMPR-IB was greater than BMPR-II. In all three follicular categories studied, the expression of SMAD-5 was superior to SMAD-8. After culture, follicles showed reduced levels of mRNA for BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPR-IA and SMAD-5. In conclusion, β -tubulin and PGK genes are the two most stable *housekeeping* for fresh goat follicles 0.2, 0.5 to 1 mm in diameter. BMPs, their receptors and SMADs have specific expression patterns in each category follicular studied. However, in cultured follicles showed a variation in the variation in the expression of BMP system components, differing from *in vivo* expression of follicles with the same size.

Keywords: Goat, Follicles, Ovary, *Housekeeping* genes, mRNA, BMPs

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1. Caracterização morfológica da foliculogênese.....	17
--	----

Capítulo 1

Figura. 2. Via de sinalização das BMPs.....	26
--	----

Capítulo 2

Figura. 3. Fluorescência emitida em cada ciclo da qRT-PCR.....	50
---	----

Figura. 4. Molécula de SYBRGreen entre fita dupla de DNA.....	51
--	----

Figura. 5. Sonda TaqMan. F: Fluoróforo; Q: <i>quencher</i>	52
---	----

Capítulo 3

Figura 1 - Figure 1. Stability of <i>housekeeping</i> genes in goat pre-antral follicles of 0,2, 0,5 and 1 mm in diameter, before (A) and after (B) elimination of the least stable <i>housekeeping</i> gene (18S rRNA).....	81
---	----

Figura 2 - Figure 2. Relative expression of mRNA for BMP-2 (A), BMP-4 (B), BMP-6 (C), BMP-7 (D), BMP-15 (E), BMPR-IA (F), BMPR-IB (G), BMPR-II (H), SMAD-1 (I), SMAD-5 (J), SMAD-8 (K), in goat follicles with a diameter of 0,2, 0,5 and 1 mm.....	82
--	----

Figura 3 - Figure 3. Relative expression of mRNA for BMPs in 0,2 mm (A), 0,5 mm (B) and 1 mm (C) goat follicles, for BMPRs in 0,2 mm (D), 0,5 mm (E) and 1 mm (F) follicles, and for SMADs in 0,2 mm (G), 0,5 mm (H) and 1 mm (I) follicles.....	86
---	----

Figura 4 - Figure 4. Relative expression of mRNA for BMP-2 (A), BMP-4 (B), BMP-6 (C), BMP-7 (D), BMP-15 (E), BMPR-IA (F), BMPR-IB (G), BMPR-II (H), SMAD-1 (I), SMAD-5 (J), SMAD-8 (K), in goat follicles after their culture for 18 days.....	90
---	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Fatores, Receptores e SMADs da família BMP.....	25
--	----

Capítulo 3

Tabela 1 - Table 1: Primer pairs used in real-time PCR for quantification of <i>housekeeping</i> genes in fresh caprine follicles.....	79
---	----

Tabela 2 - Table 2: Primer pairs used in real-time PCR for quantification of growth factors mRNAs in fresh caprine follicles.....	80
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 CAPÍTULO 1: As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seu papel na regulação da oogênese e foliculogênese ovariana em mamíferos.....	19
2.2. CAPÍTULO 2: A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a importância dos genes de referência.....	46
3. HIPÓTESES.....	60
4. JUSTIFICATIVA.....	61
5. OBJETIVOS.....	62
5.1. Gerais.....	62
5.2. Específicos.....	62
6. CAPÍTULO 3: Stability of <i>housekeeping</i> genes and levels of mRNA for bone morphogenetic proteins and their receptors in goat ovarian follicles.....	63
7. CONCLUSÕES.....	99
8. PERSPECTIVAS.....	100
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

Os caprinos são uma espécie de elevada importância econômica pela sua contribuição na produção de carne, leite e pele em diversos países. Tendo em vista que os caprinos exercem importante papel econômico no país, é essencial o estudo dos fatores que controlam o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária nesta espécie. O conhecimento da fisiologia ovariana poderá contribuir para otimizar a eficiência de várias biotecnologias que visam aumentar o potencial reprodutivo de animais de alto padrão genético, contribuindo para um aumento na produtividade animal.

A oogênese e a foliculogênese ocorrem simultaneamente durante o crescimento dos folículos ovarianos e são regulados por gonadotrofinas, somatotrofinas e por fatores intra-ovarianos. A oogênese em ruminantes inicia-se antes do nascimento e consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) até a formação do oócito haplóide fecundado, entretanto, somente alguns oócitos conseguem completar este processo meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação (FIGUEIREDO *et al.*, 2003). As oogônias iniciam a meiose e quando alcançam o estágio de diplóteno da prófase I passam a ser chamados de oócitos primários. Neste momento, os oócitos são circundados pelas células da pré-granulosa para a formação do folículo primordial, que permanecem neste estágio até a puberdade (MOORE e PERSAUD, 2008). A foliculogênese envolve a formação do folículo primordial e o crescimento de folículos primários e secundários até o estágio de folículo *De Graaf* ou pré-ovulatório (Figura 1) (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Ainda durante o desenvolvimento intra-uterino, formam-se milhares de folículos ovarianos, que suportam um ambiente adequado para o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT e SMITZ, 2001), mas a maioria não chega a ovulação (cerca de 99,9%), mas morrem por atresia durante o crescimento e maturação (MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Inúmeros fatores de crescimento sintetizados pelas células foliculares atuam modulando o efeito dos hormônios e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos. Dentre os fatores que regulam as funções ovarianas, destacam-se as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Das 20 BMPs já descritas, apenas as BMPs dos tipos 2, 3, 3b, 4, 6, 7 e 15 foram localizadas em ovários mamíferos (MASSAGUÉ 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).

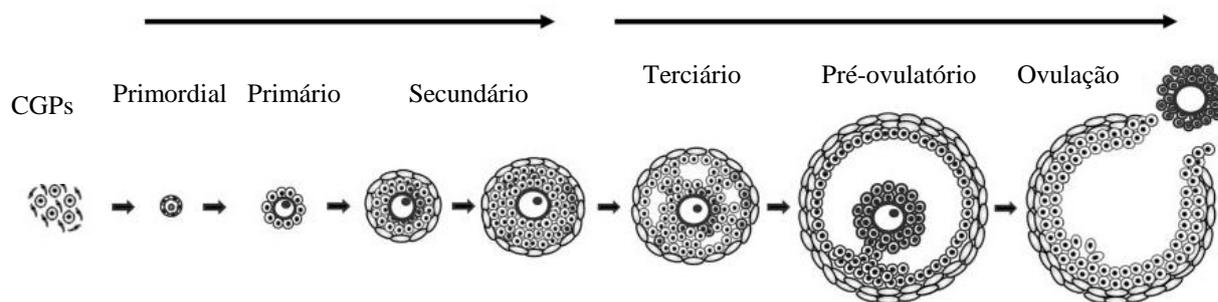


Figura 1: Caracterização morfológica da foliculogênese (EDSON *et al.*, 2009).

O estudo *in vivo* e *in vitro* das proteínas morfogenéticas ósseas em ovários caprinos podem contribuir para a compreensão da oogênese, da foliculogênese e da atresia folicular, contribuindo assim para otimizar a produção, em larga escala, de embriões viáveis e contribuir para aumentar a eficiência das biotecnologias reprodutivas. Os pequenos ruminantes apresentam-se como um bom modelo para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas de animais domésticos. A produção de embriões *in vitro* (PIV) tem a capacidade potencial de gerar maior quantidade de descendentes de fêmeas de alto valor genético. Dentre as biotecnologias reprodutivas disponíveis, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais (MOIFOPA) vem sendo aprimorada nos últimos anos e consiste em uma das principais ferramentas utilizadas atualmente para a elucidação da foliculogênese inicial. Tal biotécnica consiste no isolamento, conservação e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, visando a estocagem, ativação, crescimento e maturação *in vitro* do folículo primordial até o estágio pré-ovulatório (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), prevenindo-se, assim, a ocorrência da atresia. Com a utilização da técnica de cultivo *in vitro* milhares de oócitos podem ser crescidos, maturados e fertilizados *in vitro*, com a finalidade de produzir embriões *in vitro*. Recentemente, foram produzidos embriões *in vitro* a partir oócitos oriundos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (roedores: XU *et al.*, 2006, suínos: WU e TIAN, 2007, caprinos: MAGALHÃES *et al.*, 2010, SARAIVA *et al.*, 2010, ovinos: ARUNAKUMARI *et al.*, 2010). No entanto, apesar do grande número de folículos cultivados, o número de embriões produzidos *in vitro* ainda é muito pequeno, pois a grande maioria dos oócitos ainda não estão aptos aos processos de maturação e fertilização *in vitro*. Desta forma, a quantificação dos níveis de RNA mensageiro para as BMPs, seus receptores e mensageiros intracelulares nos folículos ovarianos crescidos *in vivo* e *in vitro* é essencial para a compreensão da fisiologia ovariana e para otimizar a produção de embriões caprinos a partir de oócitos oriundos de folículos pré-antrais crescidos *in vitro*.

A técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) tem sido utilizada com sucesso para avaliar a expressão de um gene por meio da quantificação dos níveis de RNAm num determinado tipo de célula. Nesta técnica, é necessário utilizar genes de referência específicos para um determinado modelo experimental e a validação destes genes para cada situação é um requisito crucial para a normalização dos dados com a finalidade de diminuir o erro entre as amostras (DHEDA *et al.*, 2004). Os genes de referências mais citados na literatura são gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH), β -actina, proteínas ribossomais (RPL), ubiquitina (UBQ), β -tubulina, RNA ribossômico 18S (RNAr 18S) e fosfoglicerato quinase (PGK).

Para uma melhor compreensão deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados ao papel das proteínas morfogenéticas ósseas no controle da foliculogênese, da técnica de PCR em tempo real e das etapas de normalização e quantificação da expressão dos RNAm.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. CAPÍTULO 1

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

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

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

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

José Jackson do Nascimento *Costa*¹, Maria Juliane *Passos*¹, Emanuela de Lima *Rebouças*¹,
José Roberto Viana *Silva*^{1,2}

¹Núcleo de Biotecnologia de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE, Brasil

²Correspondência: roberto_viana@yahoo.com

Resumo

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

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

Abstract

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

Keywords: ovarian follicles, bone morphogenetic proteins, growth factors

2.1.1. Introdução

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário e constitui-se em um ambiente ideal para que ocorram os processos de crescimento e maturação oocitária (Gosden *et al.*, 1993). A foliculogênese e a maturação oocitária são processos complexos de desenvolvimento através dos quais um folículo pré-ovulatório é formado a partir do crescimento de folículos primordiais.

A foliculogênese é regulada por um equilíbrio entre fatores extra e intra-ovarianos (Artini *et al.*, 2007). A oogênese é profundamente dependente de fatores intra-ovarianos, em especial fatores presentes no fluido folicular (Hsieh *et al.*, 2009; Padhy *et al.*, 2009), que estão positivamente relacionados com os níveis desses fatores no soro sanguíneo (Qiao e Feng, 2010). Qualquer desequilíbrio ou disfunção entre os fatores extra e intra-ovarianos pode resultar na foliculogênese anormal e desordem na oogênese (Frank *et al.*, 2008). Uma série de diferentes fatores séricos, juntamente com o microambiente do fluido intrafolicular, podem prejudicar diretamente o potencial de desenvolvimento do oócito, caso o seu equilíbrio seja alterado (Artini *et al.*, 2007; Padhy *et al.*, 2009), o que teria, conseqüentemente, um impacto negativo sobre a fecundação, desenvolvimento embrionário e evolução da gestação (Qiao e Feng, 2010).

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

Dentre os fatores de crescimento largamente estudados, estão as proteínas morfogenéticas ósseas, as BMPs, que são membros da superfamília de fatores de crescimento transformante- β (TGF- β). As BMPs são reguladoras de uma série de processos fisiológicos diretamente ligados às funções dos folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento. A BMP-2 é encontrada nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais em ovários de ratas (Erickson e Shimasaki, 2003), além de estar presente também nas células da teca de folículos antrais bovinos (Fatehi *et al.*, 2005). Já a BMP-4, por sua vez, é conhecida por, dentre outras funções, ser um potente um regulador essencial da gametogênese em múltiplas fases de desenvolvimento e promover a proliferação de células germinativas primordiais (CGPs), já tendo sido demonstrada em diferentes espécies. Já tem

sido também demonstrado que a proteína morfogenética óssea do tipo 6 está presente em oócitos de todas as categorias foliculares, em diferentes espécies (murinos: Erickson e Shimasaki, 2003; bovinos: Glister *et al.*, 2004; ovinos; Juengel e McNatty, 2005; caprinos: Silva *et al.*, 2006), agindo diretamente nos processos de proliferação celular. A BMP-7, por sua vez é conhecida por promover a ativação e crescimento de folículos primordiais em camundongos (Lee *et al.*, 2004), enquanto a BMP-15 é derivada do oócito e exerce um papel chave em diferentes aspectos do desenvolvimento folicular, que serão evidenciados ao longo deste artigo.

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

2.1.2. Superfamília dos Fatores de Crescimento Transformante β (TGF- β)

A superfamília TGF- β consiste em mais de 35 membros nos vertebrados, incluindo TGF- β s, BMPs, fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), ativinas, inibinas, substância de inibição Mulleriana (MIS) e nodal (Kingsley, 1994). Em mamíferos, a subfamília TGF- β é composta por três isoformas denominadas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3.

Uma característica estrutural da superfamília TGF- β é a presença de sete cisteínas conservadas, que estão envolvidas no dobramento da molécula em uma única estrutura tridimensional chamada um nó de cistina (Vitt *et al.*, 2001). Um resíduo de cisteína conservado que não está envolvido na formação do nó de cistina faz uma ponte dissulfeto entre as duas subunidades. Isso resulta na formação de dímeros ligados covalentemente, que é essencial para a atividade biológica dessas proteínas (Wang *et al.*, 1990).

Membros da superfamília TGF- β são sintetizados como proteínas precursoras de grandes dimensões que são compostas por uma seqüência sinal amino-terminal, um domínio e um pro-domínio maduro (domínio carboxi-terminal). O sinal amino-terminal orienta o precursor para uma via de sinalização. O pró-domínio variável pode facilitar a dimerização e a regulação dos membros da superfamília TGF- β . A sinalização da superfamília TGF- β é regulada em vários níveis, incluindo ligação e processamento dos ligantes extracelulares e interações intracelulares dos receptores (Kingsley, 1994).

A superfamília TGF- β atua através de uma família de receptores transmembranares serina/treonina quinase conhecidos como receptores para a superfamília TGF- β . Com base nas

suas propriedades estruturais e funcionais, os receptores de TGF- β são divididos em duas subfamílias: receptores do tipo I e do tipo II.

2.1.3. Subfamília de proteínas morfogenéticas ósseas

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

2.1.3.1. Receptores e via de sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas

O sistema TGF- β /BMP normalmente atua de modo parácrino, secretando ligantes que irão interagir com receptores nas células vizinhas (Lembong *et al.* 2008). Para exercer suas funções biológicas, as BMP-2, 4 e 15 interagem com dois tipos (I e II) de receptores presentes na superfície celular (Massagué e Chen, 2000). Receptores do tipo I e tipo II são glicoproteínas de aproximadamente 55 kDa e 70 kDa, respectivamente, que interagem durante a ligação. Inicialmente, as BMPs ligam-se ao receptor BMPR-II induzindo a sua ativação, em seguida, são recrutados o BMP do tipo IA (BMPR-IA) ou IB (BMPR-IB) que são

fosforilados. As regiões extracelulares destes receptores contêm cerca de 150 aminoácidos com 10 ou mais cisteínas que determinam o dobramento da região. Uma característica única dos receptores do tipo I é uma região intracelular de 30 aminoácidos imediatamente anterior ao domínio da quinase. Este trecho de 30 aminoácidos é chamado de domínio GS por causa da seqüência SGS₂GS₂GS₂GS₂GS₂ contida nessa região (Wrana *et al.*, 1994). A ligação induz a fosforilação do domínio GS no receptor tipo I pelo receptor tipo II, sendo necessária para a ativação da sinalização (Wieser *et al.*, 1995).

Os receptores do tipo I receberam nomes diferentes, por exemplo, receptor de ativina semelhante à quinase 4 (ALK4) é comumente conhecido como receptor de ativina do tipo IB (ActR_{IB}) porque pode se ligar a ativina e mediar respostas em células cultivadas (Attisano *et al.*, 1996). Receptor de BMP do tipo IA (BMPR-IA) e receptor de BMP do tipo IB (BMPR-IB) são também conhecidos como receptor de ativina semelhante a quinase 3 (ALK3) e receptor de ativina semelhante a quinase 6 (ALK6), respectivamente. Receptor de ativina semelhante a quinase 8 (ALK8) é um receptor tipo I para BMP-2b e BMP-7, que é essencial para o desenvolvimento em peixe zebra (Bauer *et al.*, 2001). Devido à promiscuidade do receptor do tipo I para diferentes ligantes da superfamília TGF- β na maioria dos casos, a nomenclatura mais adequada é provavelmente a ALK.

Em ovários de ratas, a expressão dos RNAs mensageiros para BMPR-II, BMPR-IA e BMPR-IB foi demonstrada em oócitos e células da granulosa de folículos primordiais, primários, secundários e antrais. No entanto, as células da teca de folículos de ratas expressam somente os RNAs mensageiros para BMPR-IA e BMPR-IB (Erickson e Shimasaki, 2003). Em caprinos, já foi demonstrada a expressão de BMPR-II, BMPR-IA e BMPR-IB em folículos primordiais, primários e secundários, bem como em oócitos, células da granulosa e da teca de folículos antrais (Silva *et al.*, 2004a). Apesar dos receptores tipo II e tipo I participarem da transdução da sinalização intracelular das BMPs, a ligação aos receptores e a atividade sinalizante de certos ligantes é regulada por co-receptores. O Glicosilfosfatidilinositol (GPI) ligado a família de proteínas de orientação repulsiva molecular (RGM), que incluem as RGM-a, b e c, são co-receptores para BMP-2 e BMP-4, e reforçam a sinalização das BMPs (Samad *et al.*, 2005). Xia *et al.* (2007) afirmaram que RGM-b e c também são conhecidos como DRAGON e hemojuvelina, respectivamente, interagem com os receptores de BMP do tipo I e ou do tipo II, ligam-se a BMP-2 e BMP-4, mas não a BMP-7 e TGF- β 1. Nas células musculares lisas da artéria pulmonar de camundongos a sinalização de BMP-2/4 exigem o receptor BMPR-II, mas não ActR-II ou ActR-IIB. No entanto, células transfectadas com RGM-a usam tanto BMPR-II e ActR-II para a sinalização BMP-2/4,

sugerindo que RGM-a facilita o uso de ActR-II pela BMP-2/4, os receptores bem como seus respectivos mensageiros intracelulares estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores, Receptores e SMADs da família BMP.

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

A

inte
raç
ão

entre os receptores induz a fosforilação de mensageiros intracelulares (*SMADs*) que são deslocados para o núcleo, onde regulam a expressão de genes específicos (Figura 2) (Massagué, 2000). Resumidamente, as BMPs dos tipos 2, 4 e 15 fosforilam várias categorias de mensageiros, ou seja, receptores regulados (*R-SMADs*), *SMAD-1*, *SMAD-5* e *SMAD8*. Uma vez fosforilados, os *R-SMADs* formam um complexo heterotrimérico transcricional, com um *SMAD* co-regulador (*SMAD-4*), que se transloca ao núcleo e atua como fator de transcrição ligando-se de forma direta a sítios de ligação específicos dos promotores dos genes-alvo (Ohta *et al.*, 2008) ou a outros fatores de transcrição (Lembong *et al.*, 2008) ativando ou inibindo a expressão de um gene (Massagué *et al.*, 2005). Mudanças transcricionais induzidas controlam uma variedade de processos celulares envolvidos na regulação tecidual (Lembong *et al.*, 2008). O mecanismo de atuação das BMPs pode ser visto na Figura 2.

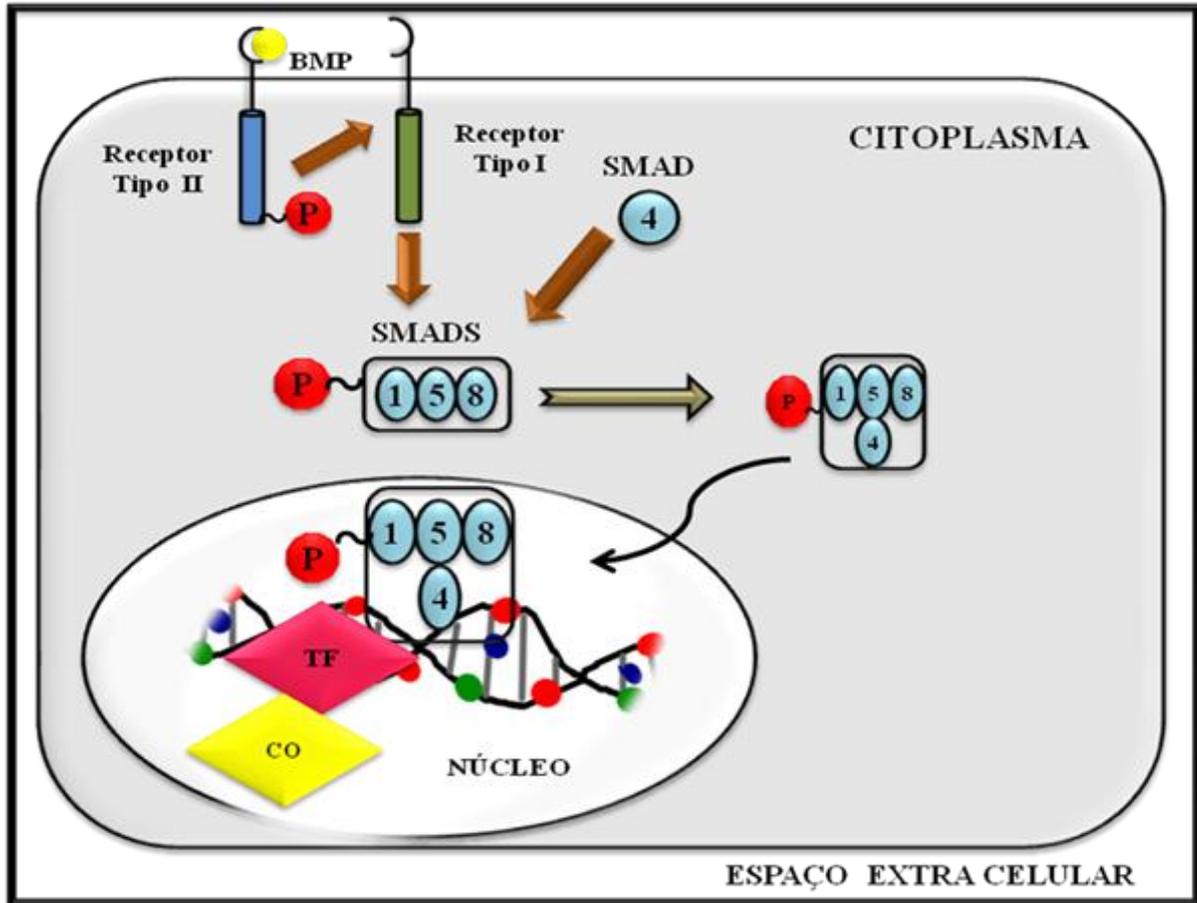


Figura. 2. Via de sinalização das BMPs. As BMPs se ligam inicialmente ao receptor tipo II, que sofre fosforilação, e recruta o receptor tipo I, que também é fosforilado. Em seguida, o receptor tipo I promove a fosforilação do complexo SMADs 1, 5 e 8 que se unem a SMAD 4, formando um complexo SMAD 1, 5, 4, 8, que é direcionado ao núcleo, ligando-se aos fatores de transcrição (TF) e co-reguladores (CO) inibindo ou ativando a expressão gênica.

Proteínas SMADs são componentes intracelulares das vias de transdução de sinal da superfamília TGF- β . O primeiro membro desta família é a proteína *Mothers Against Decapentaplegic* (MAD) que foi identificada em *Drosophila melanogaster* (Sekelsky *et al.*, 1995). Outros membros desta família foram identificados com base na sua homologia com MAD. Três homólogos da MAD encontrados em *Caenorhabditis elegans* foram nomeados como *sma-2*, *sma-3* e *sma-4*, porque a mutação nos seus respectivos genes impede o desenvolvimento, o terceiro estágio larval com tamanho corporal menor do que o tipo selvagem (Savage *et al.*, 1996). Os homólogos de *sma* e MAD encontrados nos vertebrados são chamados de SMADs, uma combinação de SMA e MAD (Derynck *et al.*, 1996). Pelo menos em 10 animais vertebrados as proteínas SMADs foram identificadas (Massagué *et al.*, 2000). A sinalização TGF- β /BMP *in vivo* pode ser acompanhada por meio de anticorpos que reconhecem a SMADs fosforiladas, pois a via de sinalização apresenta-se de forma altamente

conservada em todas as espécies (Lembong *et al.*, 2008). A localização sub-celular de fosfo-SMAD1/5 passa do núcleo para o citoplasma durante a diferenciação de CGPs em oogônias, revelando a existência de fatores intrínsecos ao oócito que regulam negativamente a sinalização BMP durante o desenvolvimento. Além disso, a imunolocalização dos receptores de BMP e fosfo-SMAD1/5 identificou as CGs como alvo da ação das BMPs (Childs *et al.*, 2010). Mutações em SMAD-2, SMAD-3 E SMAD-4 foram encontradas em tumores humanos, sugerindo que esses genes funcionam como supressores de tumor *in vivo* (Massagué, 1998). Por exemplo, SMAD-4 em humanos, também é conhecida DPC4 (deletado em carcinoma pancreático *locus* 4), é frequentemente deletada ou mutante em cânceres pancreáticos (Hahn *et al.*, 1996).

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

2.1.3.2. Proteína morfogenética óssea do tipo 2 (BMP-2)

A expressão dos RNAs mensageiros para BMP-2 foi demonstrada em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais presentes em ovários de ratas (Erickson e Shimasaki, 2003). Em bovinos, a proteína BMP-2 também foi demonstrada em células da teca e em oócitos de folículos antrais (Fatehi *et al.*, 2005).

Segundo Juengel *et al.* (2006) , através da técnica de hibridização *in situ* em ovários ovinos não foi possível a detecção do RNAm para BMP-2 em células da granulosa, células da teca, células do cúmulus ou oócitos de folículos não atrésicos em nenhuma categoria folicular. Já folículos antrais atrésicos expressam o RNAm para BMP-2 em células da granulosa que estão nos estágios finais de degeneração. Com relação aos efeitos das BMPs em folículos ovarianos, estudos *in vitro* com células da granulosa de ovinos demonstraram que a BMP-2 aumenta a produção de estrógeno e inibina-A após estimulação com FSH, promovendo assim a diferenciação das células da granulosa *in vitro* (Souza *et al.*, 2002). Em humanos, foi observado que a BMP-2 aumenta a secreção de inibina-B em células da granulosa cultivadas

in vitro (Jaatinen *et al.*, 2002). Além disso, a BMP-2 suprime a síntese de estradiol, progesterona e androstenediona e estimula a proliferação de células da teca de suínos (Brankin *et al.*, 2005). Em bovinos, a adição de BMP-2 durante a maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócito não influencia os processo de expansão das células do cúmulus, de maturação oocitária nem a formação e a qualidade dos blastocistos após fertilização *in vitro* (Fatehi *et al.*, 2005). Em ratas, BMP-2 suprime o AMPc, inibindo a síntese de progesterona e estimula a síntese de estradiol via MAPK-p38, sugerindo um papel nos eventos que antecedem a maturação folicular, tais como síntese de esteróides e inibinas (Inagaki *et al.*, 2009). A análise por RT-PCR em tempo real mostrou que a expressão de BMP-2 aumenta durante a transição da fase de proliferação de células germinativas primordiais (CGPs) (8-9 semanas) para o estágio de diferenciação meiótica (14-16 semanas). A expressão de SMAD-1 aumenta, e SMAD-5 diminui no mesmo período, indicando uma mudança em ambos os ligantes e no mediador de sinalização associadas a estes estágios de desenvolvimento (Childs *et al.*, 2010).

Foi demonstrado por Inagaki *et al.* (2009) que a BMP-2 nas concentrações de 10, 30 e 100 ng/mL aumenta a produção de estradiol induzida por FSH (30 ng/mL) pelas células da granulosa e não altera a produção de estradiol induzida por forskolina. Em contraste, BMP-2 nas mesmas concentrações inibe a produção de progesterona induzida por FSH, bem como por forskolina, entretanto, os efeitos não foram detectados quando foi realizado o co-cultivo entre células da granulosa e oócito. A expressão de aromatase P450 induzida por FSH foi ligeiramente aumentada na presença de BMP-2 em células da granulosa isoladas. Já na presença do oócito, a BMP-2 aumenta significativamente os níveis de RNAm de aromatase P450 induzida por FSH. Os níveis de RNAm para a proteína StAR induzida por FSH foram diminuídos na presença de BMP-2, entretanto não foi detectado nenhum efeito sobre os níveis de StAR durante o co-cultivo de células da granulosa e oócitos. Nas células da granulosa, o aumento da produção de AMPc induzida por FSH (30 ng/mL) foi tempo dependente, tendo sido observado uma redução na produção de AMPc induzida por FSH. Além disso, o acúmulo de AMPc induzida por FSH e por forskolina (10 µM) por 48 horas de cultivo foi diminuído pela presença de BMP-2, independentemente da presença do oócito. Em células da granulosa cultivadas, a BMP-2 (100 ng/mL) aumenta significativamente a fosforilação de p38, uma proteína mitogênica, induzida por FSH e seus efeitos foram maiores quando foram combinadas BMP-2 e BMP-4 na presença de oócitos. A BMP-2 regula a esteroidogênese induzida por FSH, não só estimulando a sinalização via MAPK-p38 induzida por FSH, mas também pela supressão da via AMPc induzida por FSH nas células da granulosa, através da

comunicação oócito-células da granulosa, desempenhando assim um papel fundamental no desenvolvimento folicular normal (Inagaki *et al.*, 2009). Recentemente, Ho e Bernard (2009) demonstraram que a BMP-2 induz a fosforilação de SMAD-1/5 e promove um aumento na expressão da subunidade β do FSH em células gonadotróficas.

No útero, a BMP-2 está presente na área decidual em locais de implantação e desempenha um papel na decidualização *in vitro* (Li *et al.*, 2007). De forma importante, foi detectado que a presença de BMP-2 no útero de camundongas resulta em decidualização ineficaz e interrupção da gestação (Lee *et al.*, 2007). Em um modelo de células-tronco do estroma endometrial em seres humanos *in vitro*, o RNAm para BMP-2 aumenta durante a decidualização e a adição de BMP-2 ao cultivo acelera a expressão de RNAm de prolactina (PRL). A proteína BMP-2 não foi observada no endométrio humano *in vivo* (Cunningham *et al.*, 1995).

2.1.3.3. Proteína morfogenética óssea do tipo 4 (BMP-4)

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

Além disso, existem evidências de que as BMPs produzidas localmente exerçam um papel importante na diferenciação das células gonadotróficas da hipófise (Scully e Rosenfeld, 2002). Já foi demonstrado que o aumento da expressão do antagonista de BMPs, *noggin*, causa uma interrupção no desenvolvimento da hipófise, resultando na ausência de quase todos os tipos de células endócrinas, incluindo as células gonadotróficas que produzem o FSH e o LH (Treier *et al.*, 1998). Além disso, BMP-4 interage com a ativina e com o GnRH para modular a secreção de FSH (Lee *et al.*, 2007; Nicol *et al.*, 2008). A expressão de SMAD-1

aumentou, e SMAD-5 diminuiu no mesmo período, indicando uma mudança em ambos os ligantes e no mediador de sinalização associadas a estes estágios de desenvolvimento (Childs *et al.*, 2010).

Um conhecido antagonista de BMP, a *noggin*, foi analisada por West *et al.*, (2010). Eles mostraram que a *noggin* é apta a inibir o crescimento de células germinativas em sistemas de cultivo. Foi demonstrado ainda que BMP-4 causa um aumento significativo na expressão de genes em células germinativas e parece ser necessário para a diferenciação de células-tronco embrionárias de humanos (hESCS) em células germinativas.

No tocante aos folículos ovarianos, o RNA mensageiro e a proteína para BMP-4, são expressos em células da teca de ratas (Erickson e Shimasaki, 2003). Já em bovinos, a BMP-4 foi demonstrada em células da granulosa e da teca (Glister *et al.*, 2004), bem como em oócitos de folículos antrais (Fatehi *et al.*, 2005).

Em estudos com folículos antrais foi observado que durante o cultivo de células da granulosa provenientes destes folículos, a BMP-4 potencializa a ação do FSH aumentando a produção de estradiol e inibindo a síntese de progesterona em ratas (Shimasaki *et al.*, 1999) e ovelhas (Mulsant *et al.*, 2001). Em humanos foi demonstrado que existe uma interrelação entre o sistema BMP e o FSH, sendo que as BMPs inicialmente inibem a expressão de receptores do FSH, enquanto o FSH estimula a sinalização endógena de BMPs. Este equilíbrio é importante para a manutenção e desenvolvimento das células da granulosa (Miyoshi *et al.*, 2006). Em bovinos, a BMP-4 aumenta a produção de estradiol, inibina-A e folistatina após estímulo com IGF-1 e inibe a produção de progesterona em resposta ao IGF-1 (Glister *et al.*, 2004), assim como inibe a apoptose de células da granulosa via survivina (Kayamori *et al.*, 2009). Para entender como a BMP-4 inibe a produção de progesterona pelas células da granulosa de ovinos, Pierre *et al.* (2004) demonstraram que a BMP-4 diminui a expressão dos genes regulados pelo AMPc, da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) e da enzima de clivagem de cadeia lateral do colesterol P450 (P450 scc). Desta forma, a BMP-4 atua como inibidor da luteinização precoce de células da granulosa de folículos antrais possibilitando o seu crescimento até o estágio de folículo pré-ovulatório (Shimasaki *et al.*, 2004). A BMP-4 promove a transição folicular de primordial para primário e o anticorpo anti BMP-4 reduz acentuadamente o número de folículos primordiais em ratas (Nilsson e Skinner, 2003).

No tocante aos efeitos da BMP-4 nos estágios finais da maturação oocitária, Fatehi *et al.* (2005) relataram que a adição de BMP-4 durante a maturação de complexos cumulus-

oócitos *in vitro* não afeta os processo de expansão das células do cúmulus e maturação oocitária, bem como a formação e a qualidade dos blastocistos após fertilização *in vitro*.

Em células da granulosa, BMP-4 tem contribuído para a redução dos níveis de apoptose *in vitro*. Após 48 h de cultivo, o tratamento combinado de 50 ng/mL de BMP-4 e BMP-7, também diminui significativamente a percentagem de apoptose das células da granulosa. A BMP-4 não afeta a expressão de bcl-xL ou bax, que são genes pro-apoptóticos. A BMP-4 estimula a expressão do RNAm para survivina quando comparado com o controle de 48 horas de cultivo (Kayamori *et al.*, 2009). Foi detectado um aumento da apoptose em CGPs, reduzindo o número de CGPs em ovários fetais humanos tratados com 100 ng/mL de BMP-4 (Childs *et al.*, 2010).

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

No cultivo de células da granulosa isoladas ou durante o co-cultivo com oócitos, a presença de BMP-4 promoveu um aumento na expressão de P450 aromatase induzida por FSH. No tocante a StAR, o RNAm foi diminuído na presença de BMP-4 quando analisadas as células da granulosa isoladas. A produção de AMPc induzida por FSH (30 ng/mL) nas células da granulosa, apresenta-se aumentada de maneira tempo-dependente. Além disso, durante o cultivo na presença de BMP-4 (100 ng/mL), demonstrou-se uma redução na produção de AMPc induzida por FSH. O acúmulo de AMPc induzida por FSH e por forskolina durante o cultivo foi diminuído pela presença de BMP-4, independentemente da presença do oócito. A BMP-4 aumenta significativamente a fosforilação de p38 induzida por FSH no cultivo de células da granulosa. A BMP-4 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento folicular normal, atuando na regulação da esteroidogênese induzida por FSH, estimulando a sinalização de p38 e MAPK induzida por FSH. A BMP-4 atua através da supressão da via de sinalização do AMPc induzida por FSH nas células da granulosa (Inagaki *et al.*, 2009).

2.1.3.4. Proteína morfogenética óssea do tipo 6 (BMP-6)

Em bovinos, a BMP-6 atua nas células da granulosa estimulando a sua proliferação, promovendo a viabilidade celular e aumentando a produção de inibina-A, ativina-A e folistatina (Leitão *et al.*, 2009). Estudos anteriores demonstraram com a utilização da técnica

de hibridização *in situ* em ovários ovinos, a expressão do RNAm codificando BMP-6 em oócitos de todas as categorias foliculares, entretanto o RNAm para BMP-6, não foi percebido em células da granulosa ou da teca em nenhuma das categorias foliculares (Juengel *et al.*, 2006). Em caprinos, a proteína para BMP-6 é expressa em oócitos de folículos ovarianos em todos os estágios de desenvolvimento (Silva *et al.*, 2006), bem como em células da granulosa e da teca de várias espécies (murinos: Erickson e Shimasaki, 2003; bovinos: Glister *et al.*, 2004; ovinos: Juengel e McNatty, 2005). Segundo Frota *et al.* (2010), a quantificação por PCR em tempo real do RNAm para BMP-6 em folículos primários e secundários são significativamente maiores do que àquelas observadas em folículos primordiais caprinos. Estudos com imunohistoquímica demonstraram a presença da proteína BMP-6 em oócitos de todas as categorias foliculares, e nas células da granulosa e do cúmulus em folículos primários e secundários. Comparado ao cultivo de folículos secundários em α -MEM, a adição BMP-6, FSH ou a combinação de BMP-6 e FSH, aumentou significativamente o diâmetro folicular. No tocante a formação de antro, houve um aumento significativo quando BMP-6 e FSH foram adicionados ao meio de cultura (Frota *et al.*, 2010).

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

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

O tratamento com BMP-6 (2, 10 e 50 ng/mL) reduz de maneira dose-dependente os níveis de secreção de progesterona (P4) induzida por forskolina em células da granulosa luteinizadas e em células da teca, sem afetar o número de células viáveis no fim do período de cultivo. O tratamento de células da granulosa com BMP-6 diminuiu os níveis de expressão de CYP11A1 induzida por forskolina em cerca de 40%, mas não teve efeitos significativos sobre

os níveis de transcrição de StAR e HSD3B1, na presença ou ausência de forskolina. A BMP-6 também aumenta a expressão basal do RNAm de CYP17A1 cerca de 5 vezes. A folistatina na concentração de 500 ng/mL reverte parcialmente o efeito supressor de BMP-6 na secreção de P4 em células da granulosa e em células da teca. Além disso, a BMP-6 diminui a secreção de ativina A na presença de forskolina (Kayani *et al.*, 2009).

2.1.3.5. Proteína morfogenética óssea do tipo 7 (BMP-7)

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

Em folículos antrais caprinos, os níveis de RNAm para BMP-7 são significativamente maiores em células da granulosa muralis/teca de grandes folículos antrais (> 3 mm) do que pequenos folículos antrais (< 3 mm). Durante o cultivo, a adição de BMP-7 (50 ng/mL), FSH (50 ng/mL) ou a combinação de ambos aumentou significativamente o crescimento folicular e a formação de antro (Frota *et al.*, 2010).

Em folículos de mulheres adultas, no entanto, a expressão de RNAm para BMP-7 foi restrita às células da granulosa, o RNAm para BMPR-IA foi detectado em células da granulosa e oócitos, enquanto que o RNAm para BMPR-IB em oócitos e a expressão do RNAm para BMPR-II esteve ausente. Estudos *in vitro*, também demonstraram que a BMP-7, na concentração de 100 ng/mL, promove a ativação e o crescimento de folículos primordiais, bem como aumenta a expressão de receptores para FSH (FSH-R) durante o cultivo de ovários de camundongas por 4 dias (Lee *et al.*, 2004). Em folículos ovinos, a BMP-7 foi detectada em todos os compartimentos celulares (Juengel *et al.*, 2006b). No cultivo *in vitro* de folículos, a BMP-7 promove a ativação e o crescimento de folículos primordiais (Lee *et al.*, 2001). Lee *et al.* (2001) injetaram BMP-7 (1 µg/mL) no interior da bolsa ovariana de ratas e caracterizaram as alterações na foliculogênese, ovulação e esteroidogênese. Foi detectado que BMP-7 reduziu o número de folículos primordiais e aumentou o número de folículos primários, secundários e antrais, indicando que a BMP-7 promoveu a ativação e o crescimento dos folículos primordiais. Além disso, a administração da BMP-7 promove mitose nas células da granulosa e inibe a produção de progesterona. Considerando que a progesterona é importante

para o processo de ovulação (Yoshimura e Wallach, 1987), a inibição da produção de progesterona pela BMP-7 pode está relacionada com os mecanismos de inibição da ovulação. Durante o cultivo *in vitro* de células da granulosa de rata foi observado que a BMP-7 modula a ação do FSH, aumentando a produção de estradiol e inibindo a síntese de progesterona (Shimasaki *et al.*, 1999). A BMP-7 foi um dos primeiros fatores identificados com ação biológica que promove a inibição da luteinização em células da granulosa (Shimasaki *et al.*, 1999). Além disso, BMP-7 aumenta a expressão da enzima P450 aromatase favorecendo a produção de estradiol (Lee *et al.*, 2001).

Em células da granulosa, demonstrou-se uma redução nos níveis de apoptose durante o cultivo destas células em meio suplementado com 50 ng/mL de BMP-7. Quando se avaliou, no mesmo cultivo os genes da apoptose *bcl-xL* ou *bax*, sua expressão não foi afetada, enquanto que a expressão do RNAm para survivina foi estimulada. No tocante a expressão de RNAm de XIAP, uma proteína inibidora da apoptose, a BMP-7 aumentou significativamente a sua expressão. O tratamento com BMP-7 na concentração de 50 ng/mL diminuiu significativamente a expressão de caspase-3 e caspase-9 ativadas (Kayamori *et al.*, 2009).

2.1.3.6. Proteína morfogenética óssea do tipo 15 (BMP-15)

A proteína morfogenética óssea - 15 (BMP-15) é um fator de crescimento derivado do oócito e tem papel chave em diferentes aspectos do desenvolvimento folicular, incluindo recrutamento do folículo primordial, proliferação das células da granulosa e células da teca, atresia e esteroidogênese (Wu *et al.*, 2007,). A BMP-15 primeiramente liga-se ao receptor BMP tipo IB, e recruta o receptor BMP tipo II (Shimasaki *et al.*, 2004). BMP-15 é sintetizada como um prepropeptídeo precursor, contendo um peptídeo sinal, um prodomínio e um domínio maduro (Chang *et al.*, 2002).

Os RNAs mensageiros para BMP-15, BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II foram detectados nos folículos primordiais, primários, secundários, bem como no oócito e células da granulosa de folículos antrais (Silva *et al.*, 2004a). Na BMP-15, o resíduo de cisteína conservado é substituído por serina, e os dímeros são formados por meio de interações não-covalentes. Foi verificado que BMP-15 poderia se ligar aos vários receptores de células da granulosa como BMPR-II, receptor de ativina tipo II, ALK-2 e ALK-6. Desses receptores, ALK-6 é o mais eficiente na ligação a BMP-15 e BMPR-II é mais eficaz na bioatividade de BMP-15 (Wu *et al.*, 2007b).

A BMP-15 foi encontrada em oócitos de todos os tipos de folículos e células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais caprinos, mas não em folículos primordiais (Silva *et al.*, 2006). Esta proteína também desempenha um papel central no desenvolvimento do folículo e da fertilidade normal em mamíferos, pois é um mitógeno para as células da granulosa, inibe a luteinização, além de promover a maturação do oócito (Wu *et al.*, 2007).

A BMP-15 mostrou-se expressa principalmente no oócito de folículos primários avançados de roedores, ovinos e em humanos (Juengel e McNatty, 2005). Através da técnica de *Western blotting*, a BMP-15 foi detectada no fluido folicular (Wu *et al.*, 2007). Foi demonstrado, através de estudos *in vitro*, que a BMP-15 desempenha também um papel fundamental na regulação das funções através dos processos de mitose, proliferação, apoptose, luteinização, metabolismo e expansão através de sinalização mitogênica e transdução (Qiao e Feng, 2010), além de participar da maturação oocitária, ovulação e formação do corpo lúteo.

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

Estudos realizados com células da granulosa de ratas demonstraram que a BMP-15 recombinante (100 ng/mL) estimula a proliferação destas células independente do FSH, mas diminui os efeitos do FSH no que se refere à produção de progesterona sem afetar a produção de estradiol (Otsuka *et al.*, 2000). Já a BMP-15 na concentração de 100 ng/mL é capaz de estimular a expressão do *Kit ligand* (KL) nas células da granulosa de ratas (Otsuka e Shimasaki, 2002). Além disso, estimula a expressão do fator de crescimento epidérmico (EGF) nas células do cúmulus de camundongas (Yoshino *et al.*, 2006). Sendo expressa em folículos antrais, foi sugerido em estudos com ovelhas, que a BMP-15 é requerida para o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios (Juengel *et al.*, 2002).

Além disso, a BMP-15 é considerada como sendo um fator chave obrigatório para a fertilidade feminina de diferentes espécies de mamíferos e já foi demonstrado que a deleção do gene BMP-15 induz a ocorrência de patologias diretamente relacionadas a atividade reprodutiva, tais como síndrome dos ovários policísticos e falha ovariana prematura. A BMP-

15 recombinante humana tem um grande potencial nas tecnologias de reprodução assistida para o tratamento da infertilidade (Li *et al.*, 2009).

O gene BMP-15 está localizado no cromossomo X e ratas com o gene para BMP-15 deletado apresentam disfunções nas células do cúmulus (Yan *et al.*, 2001). Estudos genéticos estão trazendo evidências de que a BMP-15 é um importante fator produzido pelo oócito que pode regular as funções de células somáticas em ovários de ratas (Yan *et al.*, 2001; Hanrahan *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2004, 2008; McNatty *et al.*, 2005; McIntosh *et al.*, 2008).

Dados de PCR em tempo real detectaram que, em folículos cultivados houve uma diminuição significativa dos níveis de transcritos de BMP-15, sendo demonstrado ainda uma diminuição de até 5 vezes nos níveis de RNAm para BMP-15 durante o desenvolvimento folicular. Já os níveis de transcritos de BMP-15 diminuíram significativamente em até 2.5 vezes, enquanto que os níveis de transcritos para BMP-15 encontrados em oócitos *in vivo*, foram semelhantes aqueles obtidos após 8 dias de cultivo *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2009). Após a indução da ovulação nestes oócitos cultivados, a extrusão do corpúsculo polar se deu 16 horas mais tarde. Quando foram comparados os níveis de transcrição de oócitos em diferentes estágios de maturação (Vesícula Germinativa ou Meiose II) *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a BMP-15 apresentou-se de forma significativamente maior na vesícula germinativa de oócitos cultivados. Quando os níveis de BMP-15 em oócitos em Meiose II *in vitro* e *in vivo* foram comparados, os resultados foram significativamente menores naqueles cultivados, em comparação com oócitos *in vivo* de ratas com 29 dias de idade (Sánchez *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que BMP-15 apresenta alta afinidade de ligação com ALK6, já BMPRII é o mais potente inibidor da bioatividade de BMP-15. Desta forma, a sinalização de BMP-15 pode ser mediada pela ligação inicial com ALK6 que recruta BMPRII para o complexo (Edwards *et al.*, 2008).

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

2.1.4. Considerações finais

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

2.1.5. Referências bibliográficas

Abir R, Garor R, Felz C, Nitke S, Krissi H, Fisch B. Growth hormone and its receptor in human ovaries from fetuses and adults. *Fertil Steril*, v.90, p.1333-1339, 2008.

Artini PG, Monteleone P, Toldin MRP, Matteucci C, Ruggiero M, Cela V, Genazzani AR. Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. *Expert Rev Endocrinol Metab*, v.2, p.215–2, 2007.

Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massagué J. Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol*, v.16, p.1066–1073, 1996.

Bauer H, Lele Z, Rauch GJ, Geisler R, Hammerschmidt M. The type I serine/threonine kinase receptor Alk8/Lost-a-fin is required for Bmp2b/7 signal transduction during dorsoventral patterning of the *zebrafish* embryo. *Development*, v.128, p.849–858 2001.

Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG. BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol*, v. 29(4), p.593-604, 2005.

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

Childs AJ, Kinnell HL, Collins CS, Hogg K, Bayne RAL, Green SJ, McNeilly AS, Anderson RA. BMP signalling in the human fetal ovary is developmentally-regulated and promotes primordial germ cell apoptosis. In: Abstracts of the 26th Annual Meeting of ESHRE, 2010, Rome, Italy.

Cunningham NS, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Reddi AH, Lee SJ. Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3. *Growth Factors*, v.12, p.99–109, 1995.

Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massagué J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF- β family signals. *Cell*, v.87, p.173, 1996.

Edwards SJ, Reader KL, Lun S, Western A, Lawrence S, McNatty KP, Juengel JL. The Cooperative Effect of Growth and Differentiation Factor-9 and Bone Morphogenetic Protein (BMP)-15 on Granulosa Cell Function is Modulated Primarily through BMP Receptor II. *Endocrinology*, v.149, p.1026–1030, 2008.

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 Endoc*, v.1, p.9, 2003.

Fatehi AN, Van den Hurk R, Colenbrander B, Daemen AJ, Van Tol HT, Monteiro RM, Roelen BA, Bevers MM. Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP-2 and BMP-4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, v.63, p.872–889, 2005.

Frank S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, v.14, p.367–378, 2008.

Frota, IMA. *Estabilidade de Genes de Referência e Influência das Proteínas Morfogênicas Ósseas 6 E 7 sobre o Desenvolvimento In Vitro de Folículos Pré-Antrais Caprinos.* 2010. 102f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia (PPGB), Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, Ce.

Galloway Sm, Mcnatty Kp, Cambridge Lm, Laitinen Mp, Juengel JI, 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. *Nature Genetics*, v. 25, p.279-283, 2000.

Gayta F, Gayta M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B, Garrido N, Sánchez-Criado JE, Millar RP, Pellicer A, Fraser HM, Tena-Sempere M. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 296, p.E520–E531, 2009.

Glister C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*, v.127, p. 239-254, 2004.

Gosden RG, Boland NI, Spears N, Murray AA, Chapam M, Wade JC, Zohdy NI. The biology and technology of follicular oocyte development *in vitro*. *Reprod Med Rev*, v.2, p.29-152, 1993.

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18. *Science*, v.271, p.350–353, 1996.

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

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

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

Ho CC, Bernard DJ. Bone Morphogenetic Protein 2 Signals via BMPR1A to Regulate Murine Follicle-Stimulating Hormone Beta Subunit Transcription. *Biol Reprod*, v. 81, p.133–141, 2009.

Hsieh M, Zamah AM, Conti M. Epidermal Growth Factor-Like Growth Factors in the Follicular Fluid: Role in Oocyte Development and Maturation. *Semin Reprod Med*, v.27, p.52–61, 2009.

Inagaki K, Otsuka F, Miyoshi T, Yamashita M, Takahashi M, Goto J, Suzuki J, Makino H. p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulated Steroidogenesis in Granulosa Cell-Oocyte Cocultures: Role of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4. *Endocrinology*, v. 150(4), p.1921–1930, 2009.

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

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

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

Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ, McNatty 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.

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

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

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

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

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

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CVE, Korving JPWFM, Hogan BLM. BMP4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*, v.13, p.424–436, 1999.

Lee KB, Khivansara V, Santos MM, Lamba P, Yuen T, Sealfon SC, Bernard DJ. Bone morphogenetic protein 2 and activin A synergistically stimulate follicle-stimulating hormone beta subunit transcription. *J Mol Endocrinol*, v.38, p.315–330, 2007.

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

Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SK, Shimasaki S, Lee S, Lee KA. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev*, v.69, p.159-163, 2004.

Leitão CCF, Brito IR, Frota IMA, Silva JRV. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Acta Sci Vet*, v.37(3), p.215-224, 2009.

Lembong JMA, Yakoby N, Shvartsman SY. Spatial Regulation of BMP Signaling by Patterned Receptor Expression. *Tissue Engineering: Part A*, v.14, number 9, 2008.

Li H, Dai K, Tang T, Zhang X, Yan M, Lou J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*, v.356(4), p.836-42, 2007.

Li Q, Rajanahally S, Edson M, Matzuk MM. Stable expression and characterization of N-terminal tagged recombinant human bone morphogenetic protein15. *Mol Human Reprod*, v.15, n.12, p.779-788, 2009.

Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem*, v.67, p.753–791, 1998.

Massagué J. How cells read TGF- β signals. *Nature Rev*, v.1, p.169-178, 2000.

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev*, v.14, p.627-644, 2000.

Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Development*, v.19, p.2783–2810, 2005.

McIntosh CJ, Lun S, Lawrence S, Western AH, McNatty KP, Juengel JL. The proregion of mouse BMP15 regulates the cooperative interactions of BMP15 and GDF9. *Biol Reprod*, v.79, p.889–896, 2008.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction*, v.129, p.473–480, 2005.

Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, Kano Y, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H. Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Reprod*, v.74, p.1073–1082, 2006.

Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Cribiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen J-M. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *PNAS*, v. 98, n.9, p.5104–5109, 2001.

Nicol L, Faure M-O, McNeilly J R, Fontaine J, Taragnat C e McNeilly A S. Bone morphogenetic protein-4 interacts with activin and GnRH to modulate gonadotrophin secretion in L β T2 gonadotrophs. *J Endocrinol*, v.196, p.497-507, 2008.

Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*, v.69, p.1265–1272, 2003.

Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, Katagiri T, Koike T, Takaoka K. Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway. *J Bone Miner Metab*, v.26(5), p.478-84, 2008.

Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem*, v.275, p.39523-39528, 2000.

Otsuka F, Moore KR, Shimasaki S. Biological function and cellular mechanisms of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem*, v.276, p.32889-32895, 2001.

Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.8060-8065, 2002.

Padhy N, Sathya ML, Varma TR. Antral follicle size in the down regulated cycle and its relation to in vitro fertilization outcome. *J Hum Reprod Sci*, v.2, p.68–71, 2009.

Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Mandon-Pépin B 1, Monniaux D, Monget P, Fabre S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *J Mol Endocrinol*, v.33, p.805–817, 2004.

Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update*, v.0, p.1–19, 2010.

Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 8, p.11–20, 1997.

Samad TA, Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong SJ, Campagna JA, Perusini S, Fabrizio DA, Schneyer AL, Lin HY, Brivanlou AH, Attisano L, Woolf CJ. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem*, v.280, p.14122-14129, 2005.

Sánchez F, Adriaenssens T, Romero S, Smitz J. Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. *Mol Hum Reprod*, v.15, n.9, p.539–550, 2009.

Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor- β pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.93, p.790–794, 1996.

Schwartz NB. Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Editores: Conn P.M., Freeman M. E, New Jersey: *Human Press*, p. 135–146, 2000.

Scully K, Rosenfeld M. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*, v. 295, p.2231–2235, 2002.

Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.139, p.1347–1358, 1995.

Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.96, p.7282-7287, 1999.

Shimasaki S, Moore KR, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endoc Rev*, v.25, p.72-101, 2004.

Silva JRV, Van den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR. Expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.11-19, 2004a.

Silva JRV, Van den Hurk R, Van Tol HT, Roelen BA, Figueiredo JR. The Kit ligand/c-Kit receptor system in goat ovaries: gene expression and protein localization. *Zygote*, v.14, p.317-328, 2006.

Song K, Krause C, Shi S, Patterson M, Suto R, Grgurevic L, Vukicevic S, Van Dinther M, Falb D, Ten Dijke P, Alaoui-Ismaili M H. Identification of a Key Residue Mediating Bone Morphogenetic Protein (BMP)-6 Resistance to Noggin Inhibition Allows for Engineered BMPs with Superior Agonist Activity. *J Biol Chem*, v.285, n.16, p.12169–12180, 2010.

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

Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, v.135, p.111–121, 2008.

Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM, Eppig JJ. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte–cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte–granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol*, v.276, p.64–73, 2004.

Treier M, Gleiberman A S, O'Connell S M, Szeto D P, McMahon J A, McMahon A P, Rosenfeld M G. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev*, v.12, p.1691-1704, 1998.

Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJW. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol*, v.15, p.681–694, 2001.

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 USA*, v.87, p.2220–2224, 1990.

West FD, Roche-Rios MI, Abraham S, Rao RR, Natrajan MS, Bacanamwo M, Stice SL. KIT ligand and bone morphogenetic protein signaling enhances human embryonic stem cell to germ-like cell differentiation. *Hum Reprod*, v.25, n.1, p.168-178, 2010.

Wieser R, Wrana JL, Massagué J. GS domain mutations that constitutively activate T R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. *EMBO J*, v.14, p.2199–2208, 1995.

Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res*, v.1, p.267–280, 1989.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, v.370, p.341–347, 1994.

Wu YT, Lu XE, Wang TT, He RH, Xu J, Huang HF. Women with poor response to ovarian stimulation have increased follicular bone morphogenetic protein-15 levels. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v.36(5), p.439-42, 2007b.

Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod*, v.22, n.6, p.1526–1531, 2007.

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

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

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

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

Ying Y, Zhao GQ. Detection of Multiple Bone Morphogenetic Protein Messenger Ribonucleic Acids and Their Signal Transducer, Smad1, During Mouse Decidualization. *Biol Reprod*, v.63, p.1781–1786, 2000.

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

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

2.2. CAPÍTULO 2:

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e a importância dos genes de referência

2.2.1. Introdução

O conhecimento dos níveis de expressão de fatores de crescimento e hormônios envolvidos no processo de foliculogênese fornece subsídios para o aperfeiçoamento do processo de cultivo e maturação folicular (GONÇALVES *et al.*, 2007). Neste contexto, vem sendo utilizada com sucesso a técnica de PCR em tempo real, que analisa a expressão de RNAm durante o crescimento e maturação do oócito, bem como as mudanças nos perfis de expressão de genes com funções essenciais para o desenvolvimento folicular, durante o cultivo *in vitro*.

A PCR em tempo real é uma técnica que permite a replicação *in vitro* de um fragmento específico de DNA através da sua duplicação exponencial. Desta forma, a PCR é uma técnica sensível, onde uma única molécula de DNA pode servir como um modelo para a

amplificação (AZEVEDO *et al.*, 2003), sendo um método bastante rápido e eficiente para a avaliação da expressão gênica. Na PCR, a eficiência da reação é muito sensível à qualidade do RNAm inicial (FREEMAN *et al.*, 1999) e, desta forma, durante os ciclos de amplificação as diferenças intrínsecas na qualidade do cDNA também são proporcionalmente amplificadas (BUSTIN, 2002). A forma mais comum para lidar com estas dificuldades é o uso de genes de referência ou *housekeeping* para normalizar os resultados da PCR em tempo real. Este método de normalização é baseado no pressuposto de que os níveis de expressão dos genes normalizadores não são alterados de amostra para amostra (DYDENSBORG *et al.*, 2006).

Para a seleção de genes de referência mais adequados para cada modelo experimental são utilizados programas como o geNorm, que usa a média geométrica de mais de um gene de referência, porque os genes referência reduzem as variações e erros na análise da expressão final (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Outro programa utilizado é o BestKeeper que faz uma correlação entre a variação média de todos os pares de candidatos a genes de referência e calcula a média geométrica do par mais adequado (PFAFFL *et al.*, 2004), enquanto que o programa NormFinder usa uma abordagem baseada em modelos em variações de ordem entre os subgrupos e impede a seleção de genes co-regulados (ANDERSEN *et al.*, 2004).

Este capítulo visa discutir a eficiência da técnica de PCR em tempo real, os genes de referência mais frequentemente utilizados, e os programas desenvolvidos para a normalização de dados entre as amostras.

2.2.2. A reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), foi desenvolvida nos anos 80 por Mullis e Faloona e é considerada um método poderoso para uma rápida amplificação enzimática *in vitro* de seqüências específicas de DNA (BRUCE *et al.*, 1999; NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004). A PCR tem como objetivo enriquecer um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação exponencial, podendo ser utilizada até uma única molécula de DNA, que serve como molde para amplificação (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004). A capacidade de amplificar quantidades muito pequenas de DNA trouxe uma revolução não só na biologia molecular, mas também nas ciências médicas e forenses (PABLA e PABLA, 2008). A PCR é uma metodologia que pode ser realizada *in vitro* sem o uso de células (BRUCE *et al.*, 1999), apresenta diversos componentes que são uma quantidade de DNA alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleotídeos iniciadores, os quatro desoxiribonucleotídeos constituintes do DNA (desoxiadenilato, desoxitimidiato, desoxicitidilato e desoxiguanilato) e o co-fator Mg^{2+} . Esta mistura é

submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em: (1) desnaturação do DNA alvo pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96°C), de modo a separar as duas cadeias; (2) associação dos iniciadores por ligações de hidrogênio ao DNA alvo em cadeia simples e (3) extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase (tipicamente 1 minuto a 72°C) (BROWN, 2003). A eficiência e a especificidade da amplificação da PCR é dependente de vários parâmetros, tais como o comprimento do amplicon, bem como a especificidade da hibridização e da temperatura de anelamento do oligonucleotídeos. O desenho dos iniciadores (*primers*) também é de importância crucial para o sucesso dos experimentos de PCR (GERVAIS *et al.*, 2010).

2.2.3. PCR em tempo real: amplificação e quantificação

A análise das sequências transcritas de um tecido tem sido empregada na caracterização de genes desconhecidos, possibilitando a determinação de sua expressão em diferentes tecidos e diferentes estágios do desenvolvimento. Estudos de expressão gênica vêm sendo empregados em vários organismos, como humanos, suínos, bovinos e caprinos. A maioria dos estudos em suínos, bovinos e caprinos tem a finalidade de identificar e caracterizar genes relacionados a características economicamente importantes, como no caso das reprodutivas e aquelas relacionadas à resistência a doenças, sendo uma importante ferramenta para a seleção e avaliação de genes estruturais ou regulatórios (FAHRENKRUG *et al.*, 2002). Para estudar a expressão de genes em eucariotos, diversas técnicas como Northern blot e microarranjos de DNA, têm sido empregados em bovinos e humanos durante a pré-implantação de embriões (WATSON *et al.*, 1992; BILODEAU-GOESEELS e SCHULTZ *et al.*, 1997; ROBERT *et al.*, 2002), entretanto, estas técnicas exigem um grande número de amostras e requerem mais manipulação humana, o que pode possibilitar maior erro (RODMAN e BACHVAROVA, 1976; EDASHIGE *et al.*, 2000).

Dentre as metodologias disponíveis para a identificação e expressão de genes relacionados com a reprodução em caprinos, encontra-se a genômica funcional, que possibilita caracterizar os padrões de expressão de RNAm e proteínas, sendo uma estratégia muito informativa. O produto inicial da expressão gênica em um organismo é denominado transcriptoma e refere-se ao conjunto de RNAs mensageiros, cuja informação é requerida pela célula em um determinado momento (BINNECK, 2004). Desta forma, a quantidade de RNAm é um indicativo da expressão de um determinado gene (HOCQUETTE, 2005). Dentre as técnicas que possibilitam estudar os transcriptomas, a análise por PCR em tempo real

(qRT-PCR) tem se mostrado uma poderosa ferramenta para medir a abundância na transcrição e fornecer informações quantitativas valiosas sobre a expressão gênica de diferentes amostras de diferentes fontes (PETERS *et al.*, 2004; HUGGETT *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2005; WONG e MEDRANO, 2005; NOLAN *et al.*, 2006, GALIVETI *et al.*, 2010). A qRT-PCR pode ser aplicada para quantificação absoluta e relativa da expressão do gene; validação dos resultados de microarranjos de DNA; análise de variação e contagem bacteriana, viral, fúngica, etc. A técnica é uma ferramenta eficaz para medir a transcrição absoluta, fornecendo informações quantitativas valiosas sobre a expressão gênica de diferentes fontes e amostras (PETERS *et al.*, 2004; HUGGETT *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2005; NOLAN *et al.*, 2006). A quantificação da expressão gênica tem muitas vantagens sobre outras técnicas, tais como maior rapidez, facilidade da técnica, baixo custo dos reagentes e resultados rápidos. Assim, as vantagens desta técnica em relação à PCR qualitativa, é que a qRT-PCR é mais sensível, com alta confiabilidade, precisão, reprodutibilidade e menor risco de contaminação (WURMBACH *et al.*, 2003; SCHNERR *et al.*, 2001; NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

A PCR em tempo real é um método homogêneo, que inclui amplificação e análise, sem necessidade de revelações em géis, radioatividade ou manipulação da amostra. Há várias plataformas disponíveis comercialmente para combinar os ciclos da PCR com a detecção da fluorescência (FOY e PARKES, 2001). A fluorescência de marcadores ou sondas de DNA é monitorada durante cada ciclo de PCR (Figura 3). Em determinado ponto durante os ciclos, os produtos acumulados são suficientes para aumentar a fluorescência acima da linha de base. O ponto em que a fluorescência aumenta acima do limiar da fase exponencial é chamado de *ciclo threshold* (Ct) ou *crossing point* (Cp) (WITTWER e KUSUKAWA, 2002). A curva se correlaciona com a quantidade de cópias no início da reação de PCR, quanto maior o número de cópias iniciais, a fluorescência aparece mais cedo e o Ct é menor. O número de cópias relativas entre duas amostras (experimental e controle) pode ser determinada pela diferença dos valores de Ct.

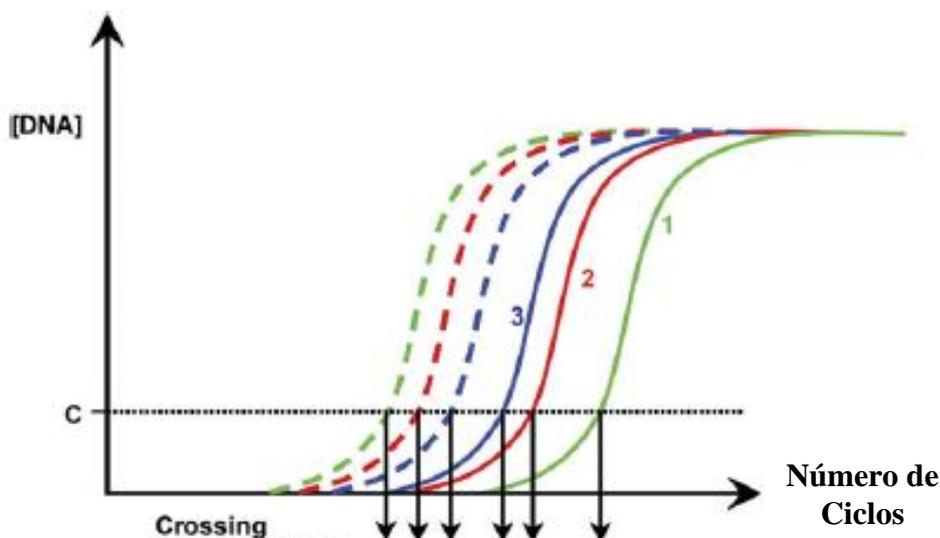


Figura. 3. Fluorescência emitida em cada ciclo da qRT-PCR. Em qRT-PCR, a intensidade da fluorescência é medida em tempo real, permitindo que o Ct seja definido para cada amostra de cDNA. A amplificação do gene alvo é mostrado por linhas coloridas e a amplificação para o gene referência por linhas pontilhadas. Cada cor corresponde a uma amostra de cDNA (GUÉNIN *et al.*, 2009).

Por ser é um processo exponencial, às vezes é difícil saber a quantidade total de DNA presente em diferentes amostras, desta forma os resultados do teste do gene são muitas vezes normalizados utilizando um gene de referência. Um método barato para quantificação relativa por PCR em tempo real é o uso de SYBRGreen, um indicador de fluorescência de produção de fita dupla de DNA (WITTEWER *et al.*, 1997). Os valores de correlação entre Ct e o número de cópias iniciais, são utilizados para calcular a eficiência de amplificação da PCR (BERNARD e WITTEWER, 2002). O SYBRGreen liga-se especificamente a dupla hélice do DNA e permite a detecção de produtos acumulados durante a PCR (Figura 4). O SYBRGreen é um método simples para a detecção e quantificação de produtos nas reações de PCR em tempo real com alta sensibilidade. Como o produto de reação e os produtos de PCR se acumulam, a fluorescência aumenta proporcionalmente à quantidade de DNA presente na amostra específica original. À medida que a amplificação começa, mais moléculas de SYBRGreen se associam as moléculas de DNA recém-sintetizadas e a fluorescência aumenta, a intensidade da fluorescência e a etapa em que ela ultrapassa a fluorescência de fundo ou fase exponencial da ampliação (Ct) é marcado (WONG e MEDRANO, 2005). Este tipo de análise tem a vantagem de ser simples, mas o SYBRGreen é um agente inespecífico podendo se ligar a qualquer dupla fita formada durante os ciclos de amplificação (MORRISON *et al.*, 1999; SUZUKI *et al.*, 2005).

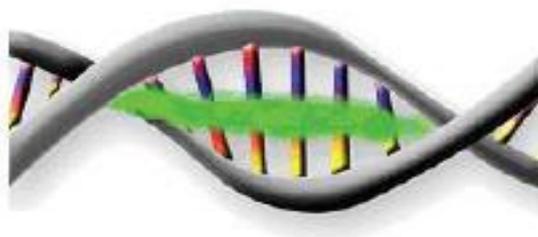


Figura. 4. Molécula de SYBRGreen entre fita dupla de DNA (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Outro método de detecção é a atividade da exonuclease 5' → 3' da *Taq* DNA polimerase, que hidrolisa uma sonda marcada com um agente fluorescente, sendo utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. A fluorescência pode ser monitorada ciclo por ciclo e a análise dos produtos pode ser executada enquanto a PCR está em andamento. Além disso, pode ser realizada não só detecção, mas também a quantificação dos produtos da PCR (HOLLAND *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 2002). Como a PCR convencional, a PCR fluorescente amplifica uma sequência de DNA entre dois *primers* específicos na presença da *Taq* polimerase (Figura 5). No entanto, na TaqMan PCR apresenta um agente fluorescente hibridizado com uma sonda. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor) (UCHIYAMA *et al.*, 2003). A *Taq* polimerase cliva a sonda durante cada ciclo de amplificação, liberando assim o agente fluorescente do *quencher*. Os produtos da reação são detectados por fluorescência gerada após a atividade de exonuclease da *Taq* DNA polimerase. O aumento da fluorescência é medido opticamente no final de cada ciclo em tempo real, e esses dados são transmitidos a um computador para análise dos resultados. O aumento da fluorescência ocorre apenas após a hibridização da sonda (NOVAIS e PIRES-ALVES *et al.*, 2004). A TaqMan PCR, elimina o processamento pós-PCR (KENDALL *et al.*, 2000).



Figura. 5. Sonda TaqMan. F: Fluoróforo: Q: *quencher* (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

2.2.4. Normalização e genes de referência

A necessidade de normalização, ou seja, da expressão dos dados nas mesmas unidades, e de calibração são inerentes à qualquer quantificação bioquímica. Os níveis de expressão de genes são geralmente normalizados para distinguir entre a variação real biológica e os desvios resultantes de processos de mensuração, tais como a variação no processo de amplificação, as disparidades na quantidade de RNAm e qualidade das amostras, erros de pipetagem e a eficiência das enzimas utilizadas para a transcrição reversa (BANDA *et al.*, 2007). Apesar de ser amplamente utilizada na quantificação das alterações do RNAm em amostras biológicas, a qRT-PCR tem alguns problemas associados ao seu uso, como a padronização dos protocolos de amplificação, atenção e coerência no que diz respeito aos reagentes utilizados e preparação do template (BUSTIN e NOLAN, 2004). É importante a escolha de um método preciso de normalização para o controle de erros. De acordo com Huggett *et al.* (2005), várias estratégias têm sido propostas para padronização de dados em RT-PCR em tempo real. A normalização usando amostras de tecidos com tamanhos e volumes semelhantes podem ser relativamente fácil, mas pode não ser biologicamente representativa, uma vez que estas amostras podem ter diferentes condições que podem levar a um erro experimental.

No caso da PCR em tempo real, a normalização pode ser conseguida com o uso de controles endógenos ou exógenos. Considerando que a calibração se baseia em amostras de referência, o controle endógeno mais utilizado são os genes *housekeeping*. Os genes *housekeepings* ou de referência podem ser utilizados como normalizadores, pois permitem o controle interno, já que estão sujeitos às mesmas condições que o RNA de interesse e também são quantificados por em tempo real. Czechowski *et al.* (2005) sugerem que muitos estudos têm optado por padronizar a normalização dos dados de expressão gênica por qRT-PCR, utilizando genes de referências, pois apresentam baixas modificações em seus perfis de expressão sob condições experimentais diversas.

Genes de referência são genes necessários para manter a homeostase das células, sendo expressos em uma grande variedade de tecidos ou tipos de células e não mostram nenhuma ou apenas variações mínimas em níveis de expressão entre as amostras individuais e as condições experimentais utilizadas. Estes genes são utilizados para normalizar níveis de RNAm dos genes de interesse antes da comparação entre diferentes amostras por qRT-PCR. A escolha adequada é fundamental para analisar corretamente os resultados de qRT-PCR (SUZUKI *et al.*, 2000; RADONIC *et al.*, 2004).

Embora o princípio de normalização, usando uma referência endógena possa parecer simples, podem haver algumas complicações ou discrepâncias (BUSTIN, 2000; THELLIN *et al.*, 1999; KAMPHUIS *et al.*, 2001). As discrepâncias são baseadas no fato de que alguns genes endógenos de referência não variam em alguns estudos, enquanto que em outros eles são claramente regulados. Assim, variáveis como as condições de cultivo, o ciclo celular, ou tratamento podem ter repercussões sobre os níveis de expressão de um gene endógeno de referência (SPANAKIS, 1993; GARCÍA-VALLEJO *et al.*, 2004). Diversos estudos relatam que não há um único gene de referência que seja adequado para todas as condições experimentais, desta forma, deve-se avaliar a viabilidade de determinados genes *housekeeping* em diferentes sistemas utilizando metodologias diferentes (SUZUKI *et al.*, 2000; HAMALAINEN *et al.*, 2001). Há relatos de variação de expressão dos supostos genes de referência (SCHMITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000; SCHMID *et al.*, 2003; RADONIC *et al.*, 2004; HUGGETT *et al.*, 2005) e assim torna-se claro que nenhum gene de referência é adequado para qualquer conjunto de condições. Vandesompele *et al.* (2002) recomendam o uso de 3-5 genes controle diferentes, dependendo do tecido.

A utilização de genes de referência sem a prévia verificação da sua estabilidade pode levar a má interpretação dos dados de expressão relativa e, com isso, gerar resultados que não representam as condições *in vivo*. É essencial a aplicação de uma estratégia de normalização para controlar a quantidade de matérias-primas, eficiências de amplificação e diferenças entre as amostras. Infelizmente, apesar de inúmeras estratégias de normalização, este continua a ser o problema mais difícil para a quantificação em tempo real (THELLIN *et al.*, 1999).

Em experimentos com qRT-PCR que dependem da extração de RNA a partir de tecidos complexos, as amostras são numerosas, as subpopulações de células variáveis e as linhagens celulares apresentam diferentes estágios de diferenciação. Diferenças celulares nos padrões de expressão do RNAm podem não ser detectadas por esta variabilidade, um problema agravado quando se tenta comparar os níveis de RNAm entre os diferentes indivíduos. Há inúmeros genes de referência utilizados para normalizar os dados de PCR em tempo real, como exemplo podemos citar β -tubulina, ubiquitina (UBQ), RNA ribossômico 18S (RNAr 18S), fosfoglicerato quinase (PGK), proteína ribossomal-19 (RPL-19), gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) e β -actina.

A β -tubulina é um componente dos microtúbulos que fazem parte do citoesqueleto das células eucarióticas, atuando em vários processos celulares, como segregação dos cromossomos durante a mitose e meiose, posicionamento e transporte intracelular de organelas (MANDELKOW e MANDELKOW, 1993). De acordo com Van Zeveren *et al.*

(2007), a β -tubulina foi considerada um gene de referência adequado para quantificar a expressão gênica relativa em *Ostertagia ostertagi*. No entanto, a β -tubulina não pareceu eficiente normalização dos estudos de PCR em tempo real em culturas de folículos pré-antrais em caprinos (FROTA *et al.*, 2010).

A ubiquitina (UBQ) é um peptídeo constituído por 76 aminoácidos, que atua nos processos de degradação protéica, reparo do DNA, transdução de sinal e regulação da transcrição por endocitose (CHRISTENSEN *et al.*, 1992; CHAN *et al.*, 1995; OKAZAKI *et al.*, 2000). É uma proteína altamente conservada, apresentando-se de forma invariável em fungos, plantas e animais, e atua ligando-se covalentemente à resíduos de lisina (Lys) nas proteínas-alvo (CALLIS e VIERSTRA, 1989; HERSHKO e CIECHANOVER, *et al.*, 1992). Em estudo para identificação de genes utilizando células da bexiga e de câncer de cólon para normalizar dados de PCR tempo real, a ubiquitina apresentou-se como gene de controle em potencial (ANDERSEN *et al.*, 2004). Ubiquitina foi um dos genes mais estáveis em células do cúmulus frescas ou cultivadas *in vitro* e em diferentes fases na meiose em oócitos bovinos (VAN TOL *et al.*, 2007). Em folículos pré-antrais caprinos antes e após o cultivo *in vitro* a ubiquitina também foi um dos genes de referência que apresentou maior estabilidade (FROTA *et al.*, 2010).

O RNA ribossômico (RNAr) eucarionte é um gene altamente conservado, constituído por subunidades, uma pequena subunidade ribossomal (RNAr 18S) e duas subunidades maiores ribossomais (RNA 5,8S e 28S), constituindo cerca 85-90% do total de RNA celular, sendo úteis como controles internos (PAULE e WHITE 2000; EICKBUSH e EICKBUSH 2007). Diversos estudos tem demonstrado o RNAr 18S como um gene de referência ideal, como em células de fígado de ratos (BUSTIN, 2000), durante o desenvolvimento embrionário (ROBERT *et al.*, 2002) e estudos com fibroblastos estimulados com soro (SCHMITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000). Entretanto, em folículos pré-antrais caprinos cultivados ou frescos, o RNAr 18S foi considerado o gene menos estável (FROTA *et al.*, 2010). Em tecido ovariano normal, ovários normais com endometriomas e tumores benignos e câncer de ovário seroso em seres humanos (FU *et al.*, 2010), o RNAr 18S apresentou maior instabilidade em comparação com outros genes de referências.

A fosfoglicerato quinase (PGK) é uma enzima glicolítica que catalisa a conversão de 1,3-difosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, sendo essencial no processo de geração de ATP durante a glicólise (COHEN-SOLAL *et al.*, 1994; HE *et al.*, 2008). Análises por PCR em tempo real revelaram que PGK é um dos genes mais estáveis em células do cúmulus em bovinos (VAN TOL *et al.*, 2007). Além disso, em células do fígado, baço e hipotálamo de

ratos, foi detectada uma estabilidade elevada (STEINAU *et al.*, 2006; POHJANVIRTA *et al.*, 2006). No entanto, em estudos com células epiteliais brônquicas em humanos, a PGK não foi considerado ideal para normalização dos resultados de PCR em tempo real (HE *et al.*, 2008).

As proteínas ribossomais são proteínas presentes nas subunidades dos ribossomos. Em eucariontes há 33 proteínas na subunidade maior do ribossomo e 50 na subunidade menor do ribossomo. Diversos estudos sugerem a utilização dos genes que codificam essas proteínas como gene de controle interno para normalizações de dados por PCR em tempo real. A RPL-15 foi utilizada como gene de referência em amostras de células do cúmulus em bovinos (VAN TOL *et al.*, 2007). Já em células do colo do útero, a RPL-4 foi considerado o gene de referência ideal (STEINAU *et al.*, 2006). Frota *et al.* (2010) comparando a expressão entre sete genes de referência em folículos pré-antrais caprinos frescos e cultivados *in vitro*, demonstraram que a proteína ribossomal 19 (RPL 19) apresentou menor estabilidade na expressão quando comparado com ubiquitina e β -actina. O gene para a RPLP0 pode ser usado para normalização de dados de PCR em tempo real células de tecido cervical de humanos (SHEN *et al.*, 2010). Já em ovinos, o uso do RNAm de RPL como gene de referência não é aconselhado devido ao baixo nível de expressão (GARCIA-CRESPO *et al.*, 2006).

O Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) é uma enzima que catalisa a sexta etapa da glicólise, processo no qual a glicose é convertida em piruvato, (SONG e FINKEL, 2007), atua ainda participando do reparo do DNA (MEYER-SIEGLER *et al.*, 1991) e da regulação transcricional (SIROVER, 2005). Além disso, o GAPDH modula a liberação de cálcio através da produção de NADH (PATTERSON *et al.*, 2005) e a sua translocação nuclear pode ainda estimular a apoptose (CHUANG *et al.*, 2005). Como um dos genes de referência mais utilizados, o GAPDH é frequentemente usado para normalizar os dados de expressão gênica, sendo usado como um controle endógeno na análise por qRT-PCR, já que em alguns sistemas experimentais, sua expressão é muito constante (EDWARDS e DENHARDT, 1985; WINER *et al.*, 1999). O GAPDH apresentou-se de maneira estável, sendo selecionado como gene de referência em oócitos bovinos (VAN TOL *et al.*, 2007). Em ovinos, o GAPDH foi indicado como gene de referência, pois sua expressão manteve-se constante (GARCIA-CRESPO *et al.*, 2006). No entanto, as concentrações de GAPDH podem variar entre diferentes indivíduos (BUSTIN e MCKAY, 1999), por exemplo, durante a gravidez (CALE *et al.*, 1997), dependendo da fase de desenvolvimento (PUISSANT *et al.*, 1994; CALVO *et al.*, 1997) e durante o ciclo celular (MANSUR *et al.*, 1993). Robert *et al.* (2005) realizaram estudos com qRT-PCR e determinaram a expressão de 1.718 genes utilizando o GAPDH como gene de referência em 72 tipos de tecidos. A expressão do gene

GAPDH não se mostrou adequado como controle interno em células arteriais de coelhos (DEINDL *et al.*, 2002), e em células nucleadas do sangue em humano (BUSTIN *et al.*, 1999), bem como em embriões de *zebrafish* (LIN *et al.*, 2009).

A β -actina é uma proteína estrutural do citoesqueleto altamente conservada e está, envolvida em processos como motilidade, estrutura e integridade celular (FROTA *et al.*, 2010). A β -actina é o gene mais amplamente empregado para a normalização em experimentos de expressão gênica (POHJANVIRTA *et al.*, 2006). Em estudos com folículos pré-antrais caprinos frescos e cultivados *in vitro*, a β -actina apresentou estabilidade elevada na sua expressão (FROTA *et al.*, 2010). Segundo Anstaett *et al.* (2010), em estudos com células linfóides em bovinos (BL-3), a β -actina mostrou estabilidade quando analisada pelo programa NormFinder. Selvey *et al.* (2001) e Barber *et al.* (2005) confirmam que a β -actina usada como gene de referência pode apresentar expressão diferenciada em diferentes tecidos.

2.2.5. Programas utilizados para normalização

Existem alguns programas utilizados para definir o gene mais estável, onde a estabilidade da expressão é conhecida como a menor variação nos níveis de expressão constitutiva das amostras analisadas (GALIVETI *et al.*, 2010). Por exemplo, o geNORM, desenvolvido pela Vandesompele *et al.*, (2002), sugere a utilização da média geométrica de mais de um gene de referência para a normalização. Uso de vários genes de referência pode reduzir as variações entre as amostras, reduzindo os erros na análise da expressão final. O BestKeeper, outra ferramenta baseada no Microsoft Excel, determina o melhor normalizador por meio da análise de correlação de todos os candidatos a gene de referência e calcula a média geométrica do mais apto (PFAFFL *et al.*, 2004). O algoritmo NormFinder usa uma abordagem baseada em modelos, tendo em vista as variações entre os subgrupos e evita a seleção de genes coregulados (ANDERSEN *et al.*, 2004).

Em 2002, o programa geNORM foi desenvolvido, sendo um dos algoritmos mais comumente usados, sido citado centenas de vezes e baixado milhares de vezes, versão 3.4 (<http://medgen.ugent.be/jvdesomp~/genorm/>) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; GUÉNIN *et al.*, 2009). O programa geNORM analisa a estabilidade de expressão gênica e determina a média de variação individual de cada candidato a gene de referência com todas os outros candidatos e classifica-os com base no valor médio de estabilidade de expressão (M), em mais estáveis ou menos estáveis (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Vandesompele *et al.*, (2002) definiu dois parâmetros para quantificar a estabilidade dos genes de referência: M

(estabilidade de expressão média) e V (média de variação dos pares). Um valor de M baixo é indicativo de uma expressão mais estável, portanto, aumentando a adequação de um determinado gene como um gene de controle, dependendo do estresse, os genes de referência mais estáveis podem não ser os mesmos (NICOT *et al.*, 2005). A confiabilidade de uma tal estratégia de validação de referência pode ser facilmente verificada, por exemplo, comparando os padrões de expressão de um determinado gene alvo obtido pela normalização utilizando os melhores candidatos a genes de referência. Se as diferenças entre os padrões obtidos com esses candidatos são menores, então a escolha de candidatos não irá afetar significativamente o perfil da expressão do gene alvo, proporcionando tranquilidade em relação à confiabilidade da normalização (GUÉNIN *et al.*, 2009). Para selecionar os melhores candidatos a genes de referência pelo geNORM, deve-se avaliar a estabilidade dos valores médios de expressão entre todos os grupos. Além disso, o geNORM também calcula a média de variação dos pares (V) entre os candidatos a genes de referência e fornece uma estimativa do número ideal de genes de referência a serem utilizados. Este valor é obtido através da análise das mudanças nos fatores de normalização, adicionando sucessivamente, os candidatos a genes de referência mais estáveis. O geNORM sugere que o fator de normalização preciso para qRT-PCR, pode ser calculado usando no mínimo três genes expressos de forma mais estável e o valor $V < 0,15$, é considerado ideal. Um valor V alto, após a inclusão para a análise de um candidato a gene de referência, indica um efeito negativo sobre o fator de normalização e, portanto, este deve ser excluído. No entanto, se a adição de um candidato a gene de referência resultou numa redução significativa do valor V, este deve ser utilizado na normalização (GALIVETI *et al.*, 2010). Ao excluir os genes que são menos estáveis, ou seja com maior valor M, os genes resultantes são os mais estáveis. Como resultado, é gerado um fator de normalização (NF), e a partir desse valor, é determinado o número ideal de genes de referência a serem usados para uma normalização precisa dos níveis de expressão de genes a serem estudados.

Em 2004, outra ferramenta baseada no Excel, o BestKeeper, foi lançada e é utilizada para determinar os genes de referência ideais, utilizando análise de correlação de pares de candidatos a genes de referência (PFAFFL *et al.*, 2004). Este programa avalia os genes através de correlações entre os valores Ct (*cycle threshold*) ou Cp (*crossing points*) e esses valores são então combinados em um índice (PFAFFL *et al.*, 2004). O BestKeeper usa uma combinação de estatísticas descritivas e análise de regressão dos valores de Ct para identificar os genes de referência com expressão mais estável. Os valores de Ct medidos em todas as amostras são agrupadas para cada gene. Genes com valores de Ct com desvios padrão > 1 são

considerados instáveis. Dois tipos de análise de regressão linear também são realizados e uma análise de regressão é realizada entre todas as combinações possíveis de genes, o nível médio total de todos os genes com desvio padrão < 1 em cada amostra são somados para criar o índice BestKeeper. Uma regressão linear é então realizada entre o índice e o Bestkeeper de cada gene. Os genes de referência mais adequados são aqueles com o maior coeficiente de correlação (r) em comparação com o índice Bestkeeper e desvio padrão < 1 (URSCHEL e O'BRIEN, 2008). O BestKeeper determina o desvio padrão, covariância por cento, e “poder” do gene de referência, para que o usuário possa selecionar os melhores genes a partir dessas três variáveis.

O NormFinder é outro programa lançado em 2004, sendo mais uma ferramenta de normalização dos resultados de qRT-PCR e utiliza uma abordagem baseada em modelos para classificar os candidatos a genes de referência com base em variações de expressão gênica em inter e intra-grupo (ANDERSEN *et al.*, 2004). Esta abordagem atribui um valor para a estabilidade de cada gene candidato e centra-se na variação que pode ocorrer entre grupos de amostras (ROBINSON *et al.*, 2007). O NormFinder é um algoritmo utilizado para encontrar os genes de referência ideais de um grupo de genes candidatos. Em contraste com o geNorm, o NormFinder leva em conta informações dos grupos de amostras, como, nenhum tratamento/tratamento-1/-2 ou tratados/saudável e o resultado é um par de genes de referência mais estáveis. Utilizando o NormFinder, o par de genes de referência resultante pode ter a expressão aumentada em um grupo experimental, mas o outro gene pode ter pouca expressão no mesmo grupo (ANDERSEN *et al.*, 2004). Isso é muito importante à luz dos conhecimentos limitados sobre a co-regulação dos genes de referência candidatos, em um determinado conjunto de teste ou modelo experimental (GALIVETI *et al.*, 2010). O modelo baseado no NormFinder é vantajoso se as subpopulações das amostras apresentam uma expressão gênica diferenciada (STEINAU *et al.*, 2006).

3. HIPÓTESES

- 1) Os genes de referência (GAPDH, β -actina, β -tubulina, PGK, UBQ, RPL-19 e RNAr 18S) apresentam diferentes níveis de estabilidade em folículos ovarianos (0,2, 0,5 e 1 mm de diâmetro) na espécie caprina.

- 2) Os níveis de RNA mensageiros para as BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-15), seus receptores (BMP-IA, BMPR-IB e BMPR-II) e SMADs (1, 5 e 8) aumentam progressivamente durante o crescimento de folículos caprinos de 0,2 mm até 0,5 e 1 mm de diâmetro.

- 3) Ocorre uma redução nos níveis de RNA mensageiros para as BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-15), seus receptores (BMP-IA, BMPR-IB e BMPR-II) e SMADs (1, 5 e 8) após o cultivo *in vitro* de folículos caprinos de ~0,2 mm.

4. JUSTIFICATIVA

Em mamíferos, o crescimento folicular é controlado por hormônios (gonadotróficos e somatotróficos) e fatores de crescimento que agem, direta ou indiretamente, de forma autócrina e/ou parácrina. De toda a população folicular presente no ovário, apenas cerca de 0,1% destes atingirá a ovulação (NUTTINCK *et al.*, 1993), enquanto os demais folículos sofrerão atresia durante o desenvolvimento (CARROLL *et al.*, 1990; OTALA *et al.*, 2002). Assim, uma melhor identificação e compreensão das diferentes substâncias envolvidas na promoção do desenvolvimento folicular e/ou atresia são aspectos importantes para subsidiar a compreensão da foliculogênese (DEMEESTERE *et al.*, 2005; TELFER, 1996). Desta forma, são necessários estudos que demonstrem os níveis de expressão dos fatores de crescimento que são normalmente produzidos pelos folículos. Dentre os fatores que atuam diretamente no ovário podemos destacar a subfamília das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Há evidências que confirmam um papel essencial das BMPs no desenvolvimento folicular.

O cultivo *in vitro* (CIV) de folículos tem como objetivo principal permitir o desenvolvimento folicular, assegurando o crescimento e a maturação dos oócitos, bem como a fertilização *in vitro* (FIV) para produção *in vitro* (PIV) de embriões. No entanto, o número de embriões produzidos *in vitro* ainda é muito pequeno porque a grande maioria dos folículos cultivados não se apresenta viável para esta finalidade. Assim, é de grande importância o estudo da expressão das BMPs durante o crescimento *in vivo* e *in vitro* de folículos de 0,2 a 1 mm de diâmetro. Além disso, o conhecimento sobre os padrões de expressão dos transcritos das BMPs é importante para otimizar a aquisição da competência oocitária *in vitro*, que pode vir a ajudar a melhorar as condições de cultivo *in vitro*.

Durante o desenvolvimento folicular *in vivo* e *in vitro*, as possíveis mudanças na expressão gênica para as BMPs, seus receptores e mensageiros intracelulares, podem ser detectadas através da quantificação dos níveis de RNAm das amostras em estudo, utilizando a técnica de PCR em tempo real, que é uma técnica bastante sensível. Para isto, há a necessidade de normalização dos dados com genes de referência apropriados para as categorias foliculares estudadas. Desta forma, é necessária a seleção de genes de referência em folículos de 0,2, 0,5 e 1 mm, para reduzir as variações e erros na análise da expressão final.

5. OBJETIVOS

5.1. Gerais

- Definir quais genes de referência são mais estáveis em folículos ovarianos de 0,2, 0,5 e 1 mm de diâmetro em caprinos.
- Quantificar os níveis dos RNA mensageiros para as BMPs 2, 4, 6, 7 e 15; receptores de BMP (BMPR-IA, IB e II); e seus mensageiros intracelulares (SMAD-1, 5 e 8) em folículos de 0,2, 0,5 e 1 mm de diâmetro na espécie caprina.
- Comparar os níveis os níveis RNAs mensageiros para as BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-15), seus receptores (BMPR-IA, IB e II) e SMADs (1, 5 e 8) em folículos de 0,5 mm de diâmetro após crescimento *in vivo* e *in vitro*.

5.2. Específicos

- Avaliar a estabilidade de genes de referência (GAPDH, β -actina, β -tubulina, PGK, RNAr 18S, RPL-19, UBQ) para quantificação de RNAm em folículos caprinos de 0,2, 0,5 e 1 mm de diâmetro.
- Comparar os níveis os níveis RNAs mensageiros para as BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-15), seus receptores (BMPR-IA, IB e II) e SMADs (1, 5 e 8) dentro de cada categoria folicular (0,2, 0,5 e 1 mm de diâmetro).

6. CAPÍTULO 3:

**Stability of Housekeeping Genes and Levels of mRNA for Bone
Morphogenetic Proteins and Their Receptors in Goat Ovarian
Follicles**

(Estabilidade de genes housekeeping e níveis de mRNA para as Proteínas Morfogênicas Ósseas e seus receptores em folículos ovarianos caprinos)

Submetido para publicação na revista *Reproduction, Fertility and Development*

Resumo

O objetivo do presente estudo foi investigar a estabilidade de sete genes de referência e avaliar a expressão relativa das proteínas morfogenética ósseas -2 (BMP-2), 4 (BMP-4), 6

(BMP-6), 7 (BMP-7), 15 (BMP-15), seus receptores (BMPR-IA, IB e II) e SMADs (1, 5 e 8) em folículos caprinos de 0,2, 0,5 e 1 mm de diâmetro, bem como em folículos secundários (0,2 mm) antes e após o cultivo. Ambos os folículos, frescos e cultivados foram submetidas à extração de RNA e síntese de cDNA. Após a amplificação do DNA por PCR em tempo real, o *software* geNorm foi utilizado para avaliar a estabilidade da GAPDH, β -tubulina, β -actina, PGK, RNAr 18S, UBQ e RPL-19. Os níveis de RNAm das BMPs, seus receptores e SMADs foram comparados entre os folículos de diferentes estágios de desenvolvimento e em folículos secundários, antes e após o cultivo por 18 dias. Os resultados mostraram que a β -tubulina e PGK foram os genes *housekeeping* mais estáveis, desta forma, podem ser utilizados como parâmetros para normalizar os dados de RNAm para as BMPs e seus receptores. Através da técnica de PCR em tempo real, foram demonstrados altos níveis de RNAm para BMP-2 em folículos de 0,2 mm. Em relação à BMP-4, BMP-6 e BMP-7, os maiores níveis de RNAm foram encontradas em folículos de 1 mm. A expressão do BMPR-IB foi maior em folículos de 0,2 mm, enquanto BMPR-II foi significativamente maior em folículos de 0,5 mm. Os níveis de mRNA para SMAD-5 foram superiores em folículos de 0,2 mm, mas os folículos de 0,5 mm apresentaram maiores níveis de mRNA para SMAD-8. Após as comparações dentro de cada categoria do folículo, BMP-15 foi mais expressa do que BMP-7 em folículos de 0,2 e 0,5 mm. Em folículos de 0,5 mm a expressão do BMPR-IB foi maior do que BMPR-II. Em todas as três categorias foliculares estudadas, a expressão da SMAD-5 foi superior a SMAD-8. Após o cultivo, os folículos cresceram para cerca de 0,5 mm. Estes folículos apresentaram redução dos níveis de RNAm para BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPR-IA e SMAD-5. Em conclusão, a β -tubulina e PGK são os genes de referência mais estável em folículos cabra de 0,2, 0,5 e 1 mm. BMPs, seus receptores e mensageiros intracelulares têm níveis variáveis de mRNA em classes de tamanho folicular analisados. Em folículos cultivados, a expressão de RNAm para BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMP-RIA e SMAD-5 sofreu redução.

Palavras-chave: caprinos, folículos, ovário, genes de referência, RNAm, BMPs

**Stability of Housekeeping Genes and Levels of mRNA for Bone Morphogenetic Proteins
and Their Receptors in Goat Ovarian Follicles**

J. J. N. Costa^A, M. J. Passos^A, C. C. F. Leitão^A, G. L. Vasconcelos^A, M. V. A. Saraiva^C, J. R. Figueiredo^C, R. van den Hurk^B, J. R. V. Silva^A

^ABiotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brazil. ^B Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands. ^C LAMOFOPA, Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil.

*e-mail: jrvsilva@ufc.br

Corresponding address (J.R.V. Silva): Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocelio Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36132603 [jrvsilva@ufc.br]

Abstract

This study investigated the stability of housekeeping genes and the levels of mRNA for bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), 4 (BMP-4), 6 (BMP-6), 7 (BMP-7), 15 (BMP-15), their receptors (BMPR-IA, IB and II) and SMADs (1, 5 and 8) in goat follicles of 0.2, 0.5 and 1.0 mm, as well in secondary follicles before and after culture for 18 days. β -tubulin and PGK were the most stable housekeeping genes and the levels of mRNA for BMP-2 in follicles of 0.2 mm were higher than in follicles 0.5 and 1.0 mm. In regard BMP-4, BMP-6 and BMP-7, the highest levels of mRNA were found in follicles of 1.0 mm. The expression of BMPR-IB was higher in follicles of 0.2 mm, while the levels of BMPR-II were higher in follicles of 0.5 mm. The levels of mRNA for SMAD-5 were higher in follicles of 0.2 mm, whereas SMAD-8 had higher level in 0.5 mm follicles. After culture, follicles showed increase levels of mRNA for BMP-2 and reduced for BMP-4, BMP-7, BMPR-IA and SMAD-5. In conclusion, β -

tubulin and PGK are the most stable reference genes, and BMPs, their receptors and SMADs have variable levels of mRNA in the follicular size classes analyzed.

Key-words: Goat, Follicles, Ovary, Housekeeping genes, mRNA, BMPs

Introduction

At birth, the mammalian ovary contains thousands of oocytes enclosed in preantral follicles (i.e. primordial, primary and secondary follicles), but 99.9% of the oocyte population will suffer atresia (Bonnet *et al.* 2008). Techniques for isolating and culturing these follicles have been developed both to study follicular development *in vitro* and to obtain a culture system which supports follicle growth and oocyte maturation. Several authors have cultured secondary follicles (~0.2 mm) up to antral stages (bovine: Gutierrez *et al.* 2000; ovine: Cecconi *et al.* 2003; caprine: Magalhães *et al.* 2010) and, recently, after maturation and *in vitro* fertilization of oocytes from secondary follicles that had grown *in vitro*, production of embryos have been described in caprine (Saraiva *et al.* 2010; Magalhães *et al.* 2010) and ovine (Arunakumari *et al.* 2010) species. However, the number of embryos produced *in vitro* is still very low because the vast majority of the cultured follicles is not viable for this purpose. Thus, to optimize embryo production from oocytes collected from *in vitro* grown follicles, it is very important to study the expression of the ligands, receptors and SMADs belonging to the family of BMPs in *in vivo* and *in vitro* grown follicles.

The bone morphogenetic protein (BMP) family is the largest within the TGF- β superfamily of growth factors (Shimasaki *et al.* 2004). Some studies have demonstrated that BMP-2, -4, -6, -7 and -15 are expressed in ovarian follicles (Erickson and Shimasaki 2003; Juengel *et al.* 2004; Campbell *et al.* 2006). These BMPs can stimulate activation and growth

of primordial follicles, and are essential for follicular development and ovulation in several species (Elvin *et al.* 2000; McNatty *et al.* 2003; Hanrahan *et al.* 2004; Di Pasquale *et al.* 2004; Shimasaki *et al.* 2004). Transduction of BMP signals is initiated when the ligands bind their serine/threonine kinase type-II (BMPR-II) and type-I receptors (BMPR-IA [also known as ALK3] and BMPR-IB [also known as ALK6] to form an oligomeric receptor complex (Kaivo-oja *et al.* 2006; Knight and Glister 2006; Massagué 1998; Schmierer and Hill 2007; Ho and Bernard 2009). Type-I receptor kinases are activated by type-II receptor kinases and then phosphorylate signal transducers, known as SMADs (Miyazono *et al.* 2010). The bone morphogenetic proteins signal via SMAD-1, SMAD-5, and SMAD-8 (Gong and Mcgee 2009). However, the levels of mRNA for BMPs, BMP receptors and SMADs in caprine follicles (0.2, 0.5 and 1.0 mm) have not yet been reported.

The technique of real-time PCR has been used successfully to evaluate changes in gene expression profiles by quantifying mRNA levels in a particular cell type. In this technique, specific reference genes are used for the normalization of the data in order to reduce the error between samples (Dheda *et al.* 2004). The housekeeping genes more commonly used for normalization are glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -actin, β -tubulin, phosphoglycerate kinase (PGK), ubiquitin (UBQ), ribosomal protein 19 (RPL-19) and 18S ribosomal RNA (18S rRNA). Although these genes are present as constituents, variations in the level of mRNA expression under certain experimental conditions show genetic instability, which makes these genes inappropriate in certain situations. Thus, validations of housekeeping genes in a particular experimental model are a crucial component in assessing any new experiment (Dheda *et al.* 2004). The most stable housekeeping genes in goat follicles with a diameter of 0.2, 0.5 and 1.0 mm are not yet known.

The aims of the present study are to investigate the stability of seven housekeeping genes and to evaluate the relative expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), 4 (BMP-4), 6 (BMP-6), 7 (BMP-7), 15 (BMP-15), their receptors (BMPR-IA, -IB and -II) and their signal transducers SMAD-1, -5 and -8 in *in vivo* grown follicles of 0.2, 0.5 and 1.0 mm, as well as to analyze the mRNA levels for these BMP-system components in 0.5 mm follicles that were cultured for 18 days.

2. Material and Methods

Ovaries and follicle isolation

Ovaries of cycling adult goats (n=20) were collected at a local abattoir, immediately after slaughter. After collection, the ovaries were washed once in alcohol 70% for about ten sec, and then twice in 0.9 % saline solution and transported to the laboratory at room temperature for up to 1 h. Then, the ovaries were carefully dissected and placed immediately in warmed α -MEM. Briefly, ovarian cortical slices (1–2 mm thick) were cut from the ovarian surface and follicles were visualized under the stereomicroscope, manually isolated using 26-gauge needles attached to a syringe and washed two times in α -MEM. After isolation, follicles were transferred to 100 μ L drops containing fresh medium at room temperature for evaluation. For this study, follicles with a diameter of approximately 0.2 (secondary), 0.5 (early antral) and 1.0 mm (antral), were selected which had an intact basal membrane and a centrally-located oocyte, surrounded by compact layers of granulosa cells. Isolated follicles from each category were randomly distributed into three groups of ten follicles for each size class which were stored at -80°C until RNA extraction.

***In vitro* culture of secondary follicles**

For *in vitro* culture, another group of isolated follicles (n=30, with a diameter of ~0.2 mm) from five ovaries were randomly transferred to 100 μ L drops containing fresh medium under mineral oil to further evaluate the follicular quality. After selection, follicles were individually cultured in 100 μ L drops of culture medium in Petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA) under mineral oil for 18 days at 39°C and 5% air CO₂. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with 3 mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 μ g/mL ascorbic acid. This culture medium was supplemented with sequential recombinant FSH (100 ng/mL from day 0 to day 6, 500 ng/mL from day 6 to day 12 and 1000 ng/mL from day 12 to day 18 of culture (Saraiva *et al.* 2010). Every other day, partial replacement of medium (60 μ L) was performed and total medium replacements were done on days 6 and 12 of culture. After culture, three groups of ten cultured follicles were collected and stored at - 80°C until RNA extraction.

RNA Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA was extracted using the TRIzol[®] reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham, Biosciences. Cambridge, England). For each sample, the RNA concentrations used to synthesize cDNA were adjusted to 44 ng/mL. Before the reverse transcription reaction, samples of RNA are incubated for 5 min at 70°C and then cooled in ice. The reverse transcription was performed in a total volume of 20 μ L composed of 10 μ L of sample RNA, 4 μ L reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São

Paulo, Brazil), 8 units RNAsin, 150 units of reverse transcriptase Superscript III, 0036 U random primers, 10 mM DTT and 0.5 mM of each dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The mixture was incubated at 42°C for 1h, subsequently at 80°C for 5 min, and finally stored at -20°C. The negative control is prepared under the same conditions, but without addition of reverse transcriptase.

PCR amplification and determination of gene stability

To identify the most stable housekeeping gene for its use in studies with goat follicles, quantification of mRNA for glyceraldehydes-2-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -tubulin, β -actin, phosphoglycerokinase (PGK), 18S rRNA, ubiquitin (UBQ) and ribosomal protein 19 (RPL-19) was performed with the use of *SYBRGreen*. Each reaction in real time (20 μ L) containing 10 μ L of SYBRGreen Master Mix[®] (Applied Biosystems, Warrington, UK), 7.3 μ L of ultra pure water, 1 μ L of cDNA and 0.85 M of each primer, and real-time PCR was performed in a thermocycler (Master Cycler, Eppendorf, Germany). The primers, chosen to carry out amplification of different housekeeping genes, are shown in Table 1. The reactions of the cDNA by PCR amplification consist of initial denaturation and polymerase activation for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 58°C and 30 sec at 60°C. The extension was held for 20 min at 72°C.

Gene stability was evaluated using the geNorm software program (Vandesompele *et al.* 2002). Briefly, this approach relies on the principle that the expression ratio of two perfect reference genes would be identical in all samples in all experimental conditions or cell types. Variation in the expression ratios between different samples reflects expression instability of one or both of the genes. Therefore, increasing variation in this ratio corresponds to decreasing expression stability. The geNorm software can be used to calculate the gene

expression stability measure (M), which is the mean pair-wise variation for a gene compared with all other tested control genes. Genes with higher M-values have greater variation in expression. The stepwise exclusion of the gene with the highest M-value allows the ranking of the tested genes according to their expression stability.

Quantification of mRNA for BMPs, their receptors and their SMADs

Quantification of mRNA for bone morphogenetic protein-2, -4, -6, -7, -15, their receptors (BMPR-IA, -IB and BMPR-II) and signal transducers (SMAD -1, -5 and -8) were performed in goat follicles of approximately 0.2, 0.5 and 1.0 mm. The housekeeping genes used to normalize the levels of mRNA were chosen in the first step of this study. In addition, mRNA of these BMP-system components were quantified and compared in noncultured follicles of 0.2 mm (day 0 of culture) and those cultured for 18 days that had reached a diameter of approximately 0.5 mm. The housekeeping genes used to normalize the levels of mRNA in follicles before and after culture were β -actin and ubiquitin, as determined in previous studies (Frota *et al.* 2010). The primers chosen to carry out amplification of different growth factors (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-15, BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II, SMAD-1, SMAD-5 and SMAD-8) are shown in Table 2. The delta-delta CT method was used to normalize the data of mRNA expression (Livak and Schmittgen 2001).

Statistical analysis

Levels of mRNA for different BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, and BMP-15), their receptors (BMPR-IA, BMPR-IB, and BMPR-II) and signal transducers (SMAD-1, SMAD-5 and SMAD-8) in in-vivo grown goat follicles were analyzed by using the non parametric Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$). Paired t test was used to compare levels of mRNA

for the different BMPs under study, their receptors and their SMADs in noncultured 0.2 mm follicles with those in 18 days cultured follicles, which measure ~0.5 mm in diameter ($P<0.05$).

3. Results

Stability of housekeeping genes in goat follicles

Analysis of starting cDNA determined gene expression stability in goat follicles and resulted in gene expression stability values M for each gene. Therefore, stepwise exclusion of unstable genes and subsequent recalculation of the average M-values resulted in a ranking of the genes based on their M-values with the two most stable genes leading the ranking. After stepwise elimination of the least stable gene (18S RNAr) it was revealed that the genes with the highest stability in goat follicles of 0.2, 0.5 and 1.0 mm in diameter were β -tubulin and PGK (Figure 1A and 1B).

Expression of BMPs, BMP receptors and SMADs in goat follicles

Real-time PCR demonstrated that the levels of mRNA for BMP-2 (Figure 2A) in follicles of 0.2 mm were higher than in follicles of 0.5 and 1.0 mm ($P<0.05$). Follicles of 1.0 mm had higher levels of mRNA for BMP-4 (Figure 2B), BMP-6 (Figure 2C) and BMP-7 (Figure 2D) than follicles of 0.2 and 0.5 mm ($P<0.05$). The levels of mRNA for BMP-15 (Figure 2E) did not differ between follicle categories ($P>0.05$).

For receptors and SMADs, the levels of mRNA for BMPR-IB (Figure 2G) were higher in follicles of 0.2 mm than those of 0.5 and 1.0 mm ($P<0.05$), but the highest level of mRNA

for BMPR-II (Figure 2H) was found in follicles of 0.5 mm ($P < 0.05$). Among follicle size classes, no significant differences were observed in levels of mRNA for BMPR-1A (Figure 2F) ($P > 0.05$). The expression of mRNA for SMAD-5 (Figure 2J) was significantly higher in follicles of 0.2 mm, when compared with follicles of 0.5 and 1.0 mm ($P < 0.05$). The levels of mRNA for SMAD-8 (Figure 2K) were higher in follicles of 0.5 mm ($P < 0.05$), but no differences among follicles were observed in the levels of mRNA for SMAD-1 (Figure 2I).

After culture for 18 days, the follicles reached a diameter of $0.59 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$. These cultured follicles showed a significant increase in the mRNA level for BMP-2 (Figure 3A) ($P < 0.05$) when compared with uncultured follicles (0.2 mm in diameter). In contrast, the mRNA levels for BMP-4 (Figure 3B) and BMP-7 (Figure 3D) had significantly declined in the cultured follicles ($P < 0.05$). The levels of mRNA for BMP-6 (Figure 3C) and BMP-15 (Figure 3E) in cultured follicles were not significantly different from those present in follicles at the start of culture ($P > 0.05$). In regard BMP receptors and SMADs, a significant reduction in the mRNA level for BMPR-IA (Figure 3F) was observed in cultured follicles ($P < 0.05$), but this was not the case for the BMPR-IB mRNA (Figure 3G) and BMPR-II mRNA levels (Figure 3H) ($P > 0.05$). The SMAD-8 mRNA level (Figure 3K), also showed a significant reduction in cultured follicles ($P < 0.05$), while *in vitro* culture did not influence the follicular mRNA levels for SMAD-1 (Figure 3I) and SMAD-5 (Figure 3J) ($P > 0.05$). Figure 4 schematically presents the changes described in the levels of mRNA for BMPs, their receptors and SMADs during *in vivo* and *in vitro* growth of secondary follicles to the antral stage.

4. Discussion

In the current study, β -tubulin and PGK were the most stable genes in goat follicles of 0.2, 0.5 and 1.0 mm. In comparison, β -actin and ubiquitin were the most stable housekeeping

genes in goat preantral follicles (0.2 mm) both before and after their *in vitro* culture (Frota *et al.* 2010). PGK was the most stable gene in cumulus cells during maturation of bovine oocytes (Van Tol *et al.* 2007). Different from bovine oocytes (Van Tol *et al.* 2007), GAPDH was considered the least stable gene in zebrafish embryos (Lin *et al.* 2009). The data confirm the conclusions of Garcia-Vallejo *et al.* (2004) that assessment of the most suitable housekeeping gene(s) for different types of animal tissues and cells is inevitably, and that no reference gene can at forehand be assumed to be suitable for them.

The current study is the first that showed levels of mRNA for BMPs, BMP receptors and SMADs in goat follicles of different stages of development. A reduction in the levels of BMP-2 was observed during the growth of follicles from 0.2 to 1.0 mm in goats. In contrast, compared to (noncultured) follicles with a diameter of ~0.2 mm, an increase in the mRNA level for BMP-2 was observed in 18-days cultured follicles which had grown up to ~0.5 mm, which indicates that culture of follicles in medium containing FSH stimulates the expression of BMP-2. Previous studies said that during the progression of folliculogenesis, BMP-2 mRNA expression increased rapidly reaching maximal levels in the granulosa cells of secondary follicles of rats (Erickson and Shimasaki 2003). This is confirmed by its high expression in follicles of 0.2 mm. In addition, antral follicles (1.0 mm) showed a larger blood supply, which enables systemic peptides to regulate the production of BMP-2, may be acting in the ovary, which may explain its low expression in 1.0 mm follicles. In cattle, the BMP-2 protein was demonstrated in the theca cells and oocytes of antral follicles (Fatehi *et al.* 2005). In our study, mRNA for BMP-4 had its highest level in follicles of 1.0 mm, but in contrast with the mRNA level of BMP-2, that of BMP-4 had significantly declined in cultured follicles. Apparently, the culture circumstances are insufficient to accomplish normal *in vivo* levels for BMP expression. In rats, BMP-4 is mainly expressed by theca cells of antral follicles (Erickson and Shimasaki 2003), but in cattle, BMP-4 protein was demonstrated in

granulosa cells, theca cells (Glister *et al.* 2004) and oocytes of antral follicles (Fatehi *et al.* 2005).

The highest mRNA levels for BMP-6 and BMP-7 were detected in follicles of 1.0 mm. Protein and mRNA for BMP-6 was demonstrated in oocytes of follicles at all stages of development, particularly in those from antral follicles in goats (Frota *et al.* 2011). BMP-6 is also expressed in oocytes, granulosa and theca cells of several other species (mice: Erickson and Shimasaki 2003; cattle: Glister *et al.* 2004; sheep: Juengel and McNatty 2005; human: Shi *et al.* 2009). Previous studies showed that BMP-6 acts on follicle development, by promoting oocyte growth and granulosa cell proliferation and differentiation (Krysko *et al.* 2008). Contrary to BMP-6, the level of mRNA for BMP-7 was reduced in cultured caprine follicles. In cultured mouse ovaries, BMP-7 enhanced the mRNA level for FSH-R (Lee *et al.* 2004). BMP-7 is produced by theca cells of secondary and antral follicles (Shimasaki *et al.* 2004). High levels of BMP-7 in antral could be due to production of BMP-7 by theca cells, which are not yet well-developed in secondary follicles, while the protein BMP-6 was found in granulosa cells, theca and oocytes in antral follicles (caprine: Frota *et al.* 2011). Growth factors such as BMP-4, -6 and -7 may act together with other systemic factors or factors locally produced *in vivo* to the active maintainer of follicular status and delay the onset of atresia and / or luteinization. The levels of mRNA for BMP-15 did not differ between the follicular size classes analyzed. Apart from FSH, BMP-15 plays a role in the selection of the dominant follicle and the maturation of oocytes (Wu *et al.* 2007b).

The expression of BMPR-IA mRNA was not significantly different among the analyzed *in vivo* grown follicle classes. In cultured follicles, however, expression of this BMP receptor was increased, indicating a possible stimulatory effect of the FSH-containing culture medium. The mRNA level of BMPR-IB was highest in follicles of 0.2 mm, while that of BMPR-II showed a peak in 0.5 mm follicles. In these latter follicles, the mRNA level for

BMPR-II was, however, lower than of BMPR-IB. Several studies reported the expression of BMP receptors in different follicular compartments of primary and antral follicles of ruminants (ovine: Wilson *et al.* 2001; Souza *et al.* 2002; bovine: Fatehi *et al.* 2005). The BMPR-IB may mediate the effects of BMPs in 0.2 mm secondary follicles. The BMPR-II is to potentiate the action of BMPs mainly from antral follicles. This explains its high expression in antral follicles. Shimazaki *et al.* (1999) found that, after the secondary stage, BMPR-II is more expressed in granulosa cells. Some studies showed that FSH regulates the expression of growth factors like BMPs, which have an important role in the activation of follicle development and subsequent follicle growth (Joyce *et al.* 1999; Thomas *et al.* 2005).

The expression of SMAD-5 was higher in follicles of 0.2 mm, while the SMAD-8 gene was more expressed in follicles of 0.5 mm. However, no differences in these SMAD expressions were observed in 18-days cultured follicles of 0.5 mm, when compared to those in noncultured follicles of 0.2 mm at the start of *in vitro* culture. Again, the differences between *in-vivo* and *in vitro* grown follicles are most likely due to culture circumstances. The same concerns SMAD-8, which mRNA levels were similar in 0.2 and 0.5 mm follicles, but showed a reduction in 0.5 mm follicles that had been cultured. Changes in levels of SMADs *in-vivo* can be due to the action of inhibitory SMADs (I-SMAD), as the SMAD-6, which has the capacity to form a complex with SMAD-4 (Co-SMAD), inhibiting the signaling of BMPs, through a negative feedback (Matsakas and Patel 2009). In cattle, SMAD-1 protein was demonstrated in granulosa cells of antral follicles, while SMAD-1 phosphorylation was induced following treatment with BMP-6 (Glister *et al.* 2004). In human granulosa/luteal cells, mRNAs for both SMAD-1 and SMAD-5 were detected (Jaatinen *et al.* 2002), while in rats, SMAD-5 was found in oocytes of follicles at all stages of follicular development (Drummond *et al.* 2002).

In conclusion, β -tubulin and PGK are the most stable reference genes in goat follicles of 0.2 mm, 0.5 mm and 1.0 mm and are therefore more useful to normalize mRNA expression in these follicle size classes. BMPs, their receptors and SMADs have a specific patterning of expression in each size-class of follicles under study. Cultured follicles, however, show expression of BMP-system components which vary from *in-vivo* grown follicles of the same size. The cultured follicles are characterized by increased expression of RNA for BMP-2 and reduced expression of BMP-4, BMP-7, BMPR-IA and SMAD-8. It is likely, that deviation in expression of BMP-system components is harmful for embryo rates obtained from oocytes collected from *in vitro* grown pre-antral follicles. Improvement of the culture system in order to reach optimal mRNA levels of BMPs, their receptors and their SMADs in cultured goats follicles seems essential for the development of large numbers of good-quality oocytes that can successfully be used in *in vitro* maturation and fertilization procedures to result in high embryo rates.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Grant N^o 501021/2009-4) and FUNCAP (Grant N^o 1717) for the financial support, and the authors thank the members of the Laboratory of Animal Reproduction of the Biotechnology Nucleus of Sobral.

Table 1: Primer pairs used in real-time PCR for quantification of housekeeping genes in fresh caprine follicles.

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense (s) Anti-	Position	Genbank accession n ^o .

		sense (as)		
GAPDH	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA	S	288- 309	GI:27525390
	ATGGCGTGGACAGTGGTCATAA	As	419-440	
β- actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	S	188-211	GI:28628620
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC	As	363-386	
RNA-18S	TTTGGTGACTCTAGATAACCTCGGGC	S	175-201	GI:58760943
	TCCTTGATGTGGTAGCCGTTTCT	As	334-358	
PGK	AGCCTTCCGAGCTTCACTTT	S	444-466	GI:77735550
	AAACCTCCAGCCTTCTTTGGCA	As	541-563	
RPL-19	ATGAAATCGCCAATGCCAACTCCC	S	89-113	GI:94966830
	TTGGCAGTACCCTTTCGCTTACCT	As	233-257	
UBQ	GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT	S	607-631	GI:57163956
	ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT	As	756-780	
β-tubulin	TTCATTGGCAACAGCACAGCCA	S	1100-1121	GI: 114052730
	TCGTTTCATGTTGCTCTCAGCCT	As	1229-1250	

Table 2: Primer pairs used in real-time PCR for quantification of growth factors mRNAs in fresh caprine follicles.

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense (s) Anti-	Position	Genbank accession n°.

		sense (as)		
BMP-2	AGGCCCTTGCTTGTCAC TTT	S	778-797	GI:213521327
	TTGAGGCGTTTCCGCTGTTT	As	875-894	
BMP-4	TCAACCAACCACGCCATTGT	S	3105-3126	GI:157092665
	TGAGTTCGGTGGGAACACAACA	As	3191-3213	
BMP-6	ACACATGAACGCCACCAACCAT	S	141-163	GI:76262832
	AGGATGACGTTGGAGTTGTCGT	As	262-284	
BMP-7	AGGCAGGCATGTAAGAAGCA	A	78-108	GI:297481859
	TTGGTGGCGTTCATGTAGGA	As	223-243	
BMP-15	AAGTGGACACCCTAGGGAAA	S	237-257	GI:8925958
	TTGGTATGCTACCCGGTTTGGT	As	362-384	
BMPR-IA	ACGTTTGCGGCCAATTGTGT	S	1664-1685	GI:116003816
	TTGTGAGCCCAGCATTCTGACA	As	1753-1774	
BMPR-IB	TTTGATGGGAAAGTGGCGT	S	653-672	GI:193876581
	TGCAGCAATGAAGCCCAAGA	As	792-811	
BMPR-II	TGTGCCAAAGATTGGCCCTT	S	1602-1621	GI:297471905
	TGCTTGCTGCCGTTTCATAGT	As	1776-1795	
SMAD-1	TTGGAATGCTGCGAGTTTCCCTTC	S	132-155	GI:14486390
	AACTGAGCTAAGAGGCTGTGCTGA	As	283-306	
SMAD-5	TGGGTCAAGATAATTCCCAGCCCA	S	304-327	GI:21070309
	TCTTCATAGGCGACAGGCTGAACA	As	406-429	
SMAD-8	AAACAACCGGGTCGGAGAGACTTT	S	729-752	GI:22532987
	AAGCCCAAGGCAGAACCTATTCCT	As	1149-1172	

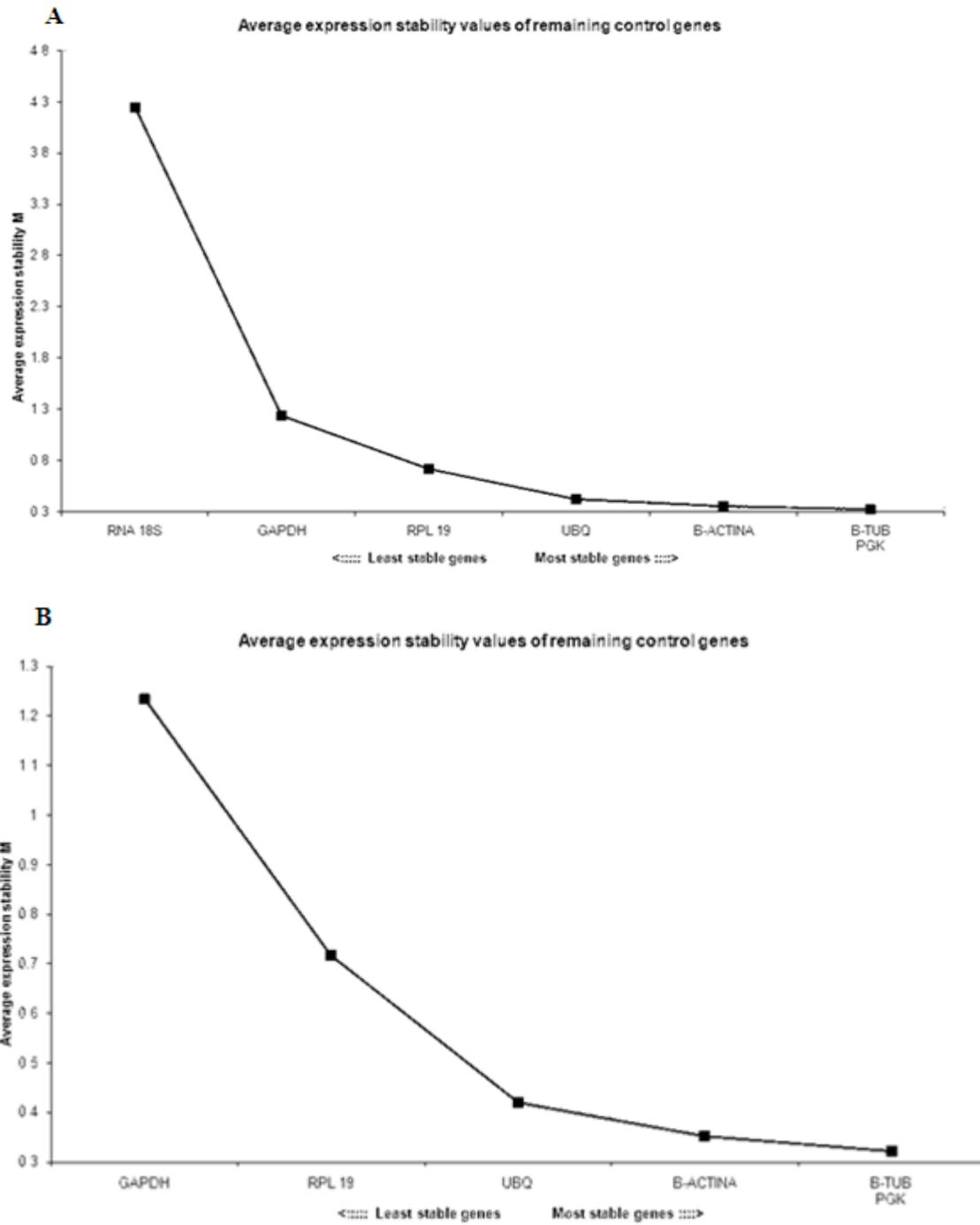
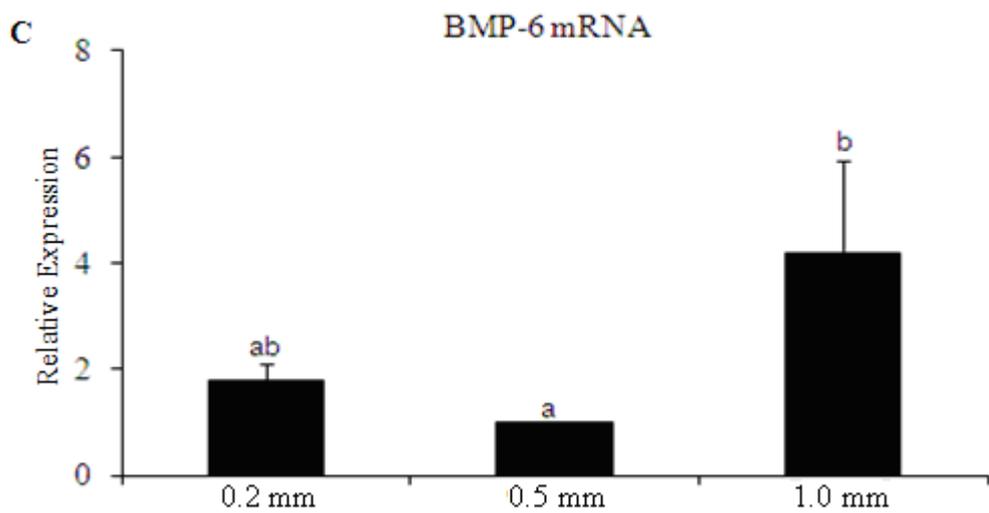
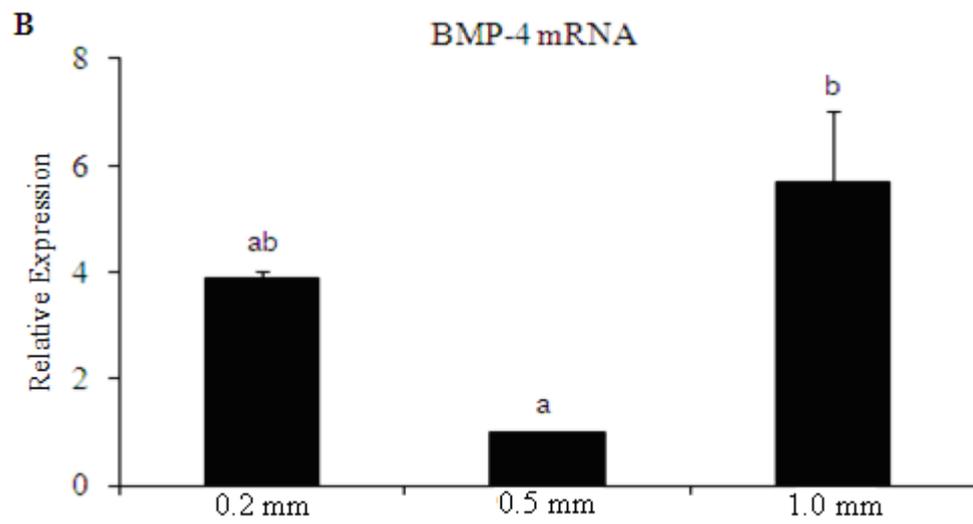
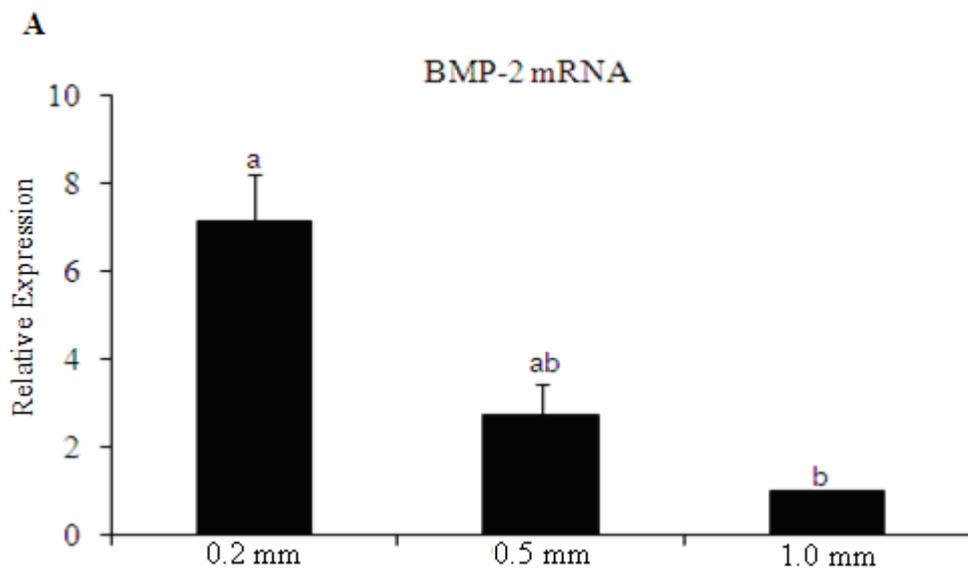
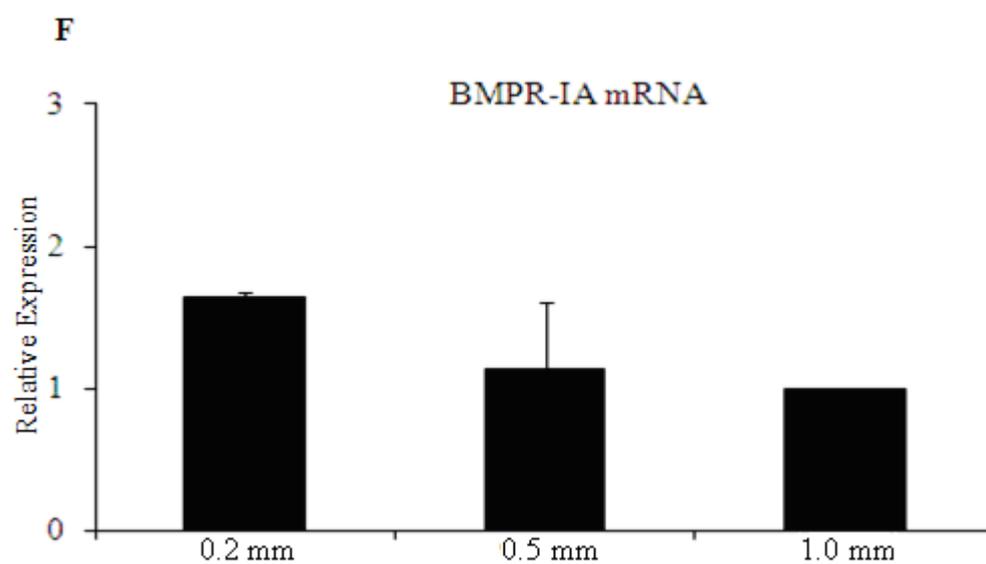
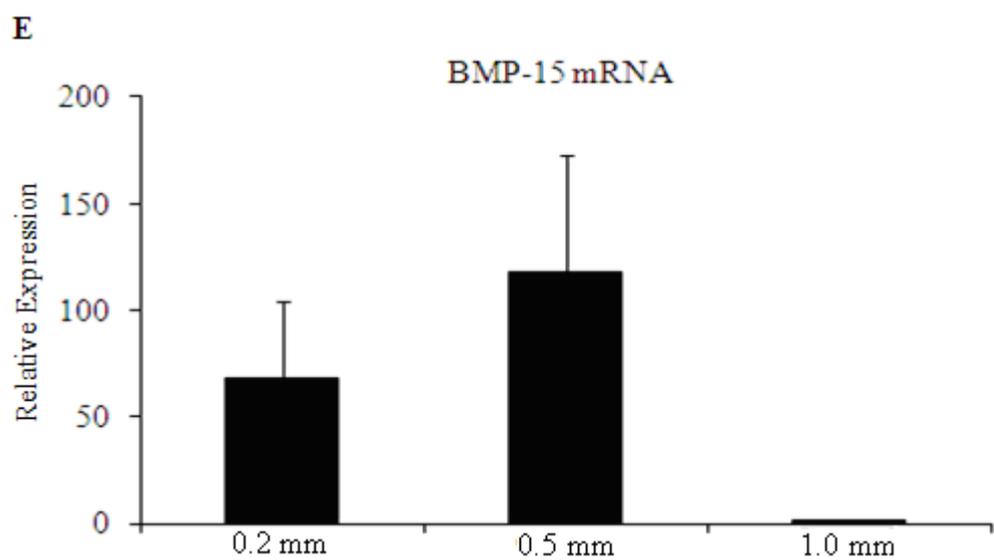
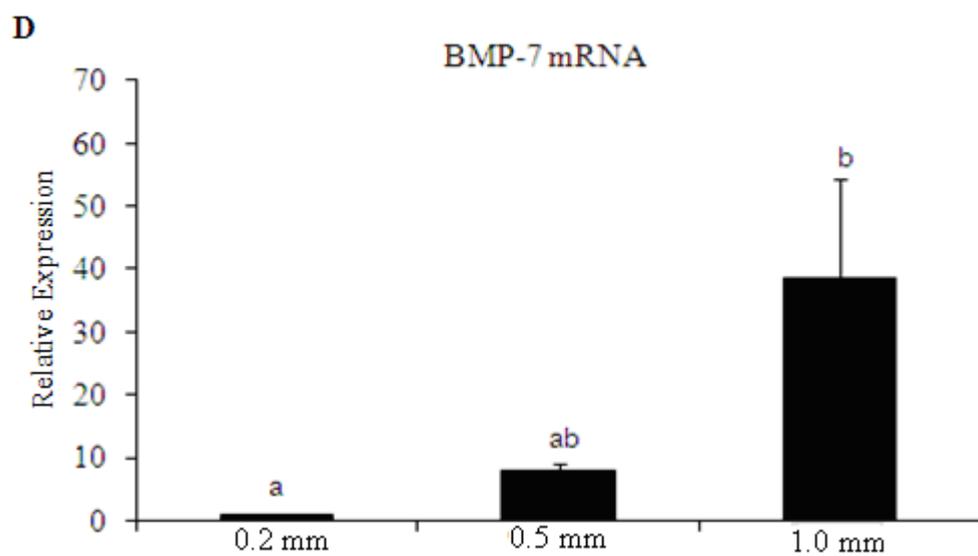
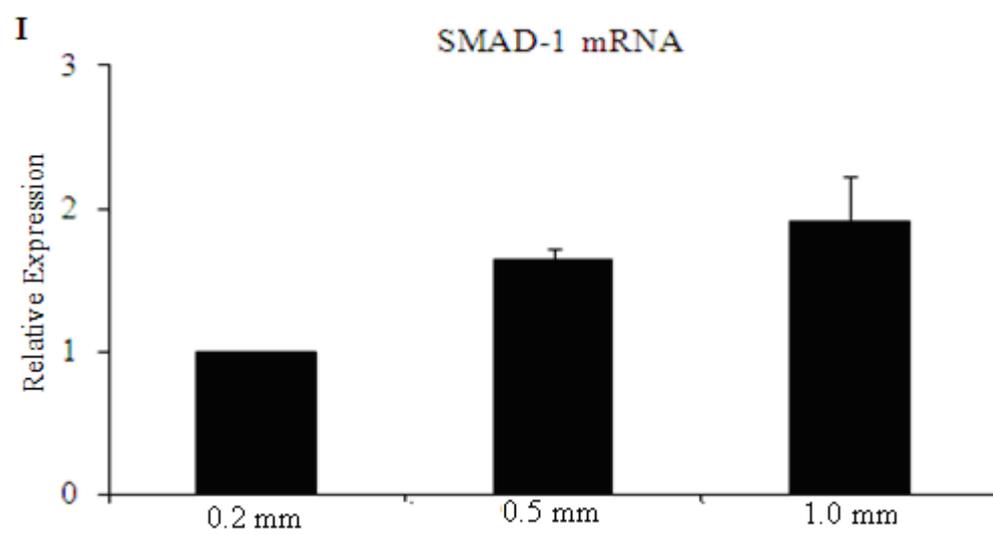
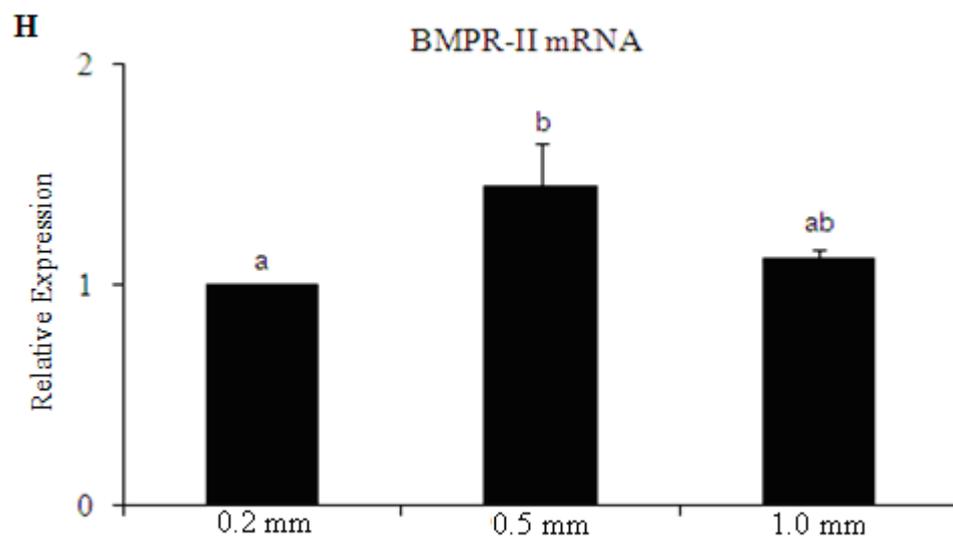
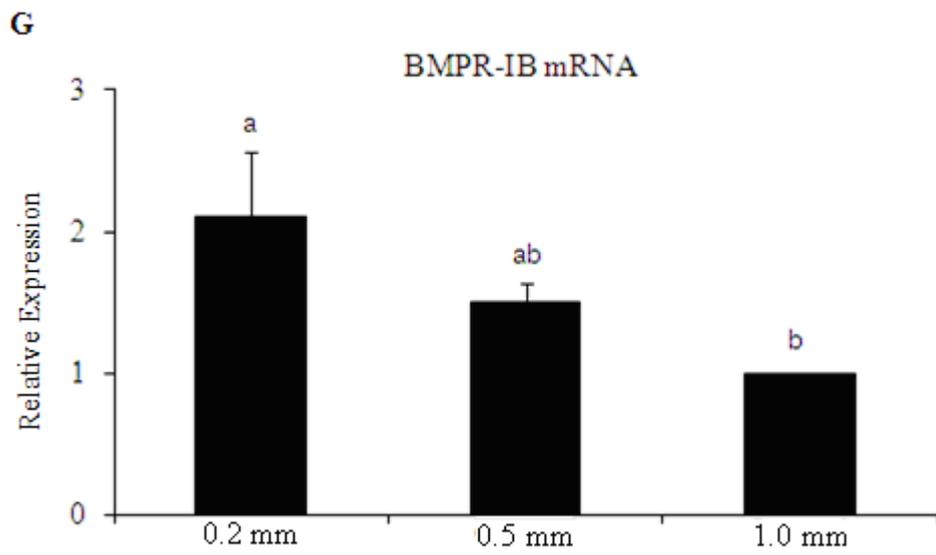


Figure 1: Stability of housekeeping genes in goat pre-antral follicles of 0.2, 0.5 and 1.0 mm in diameter, before (A) and after (B) elimination of the least stable housekeeping gene (18S RNAr).







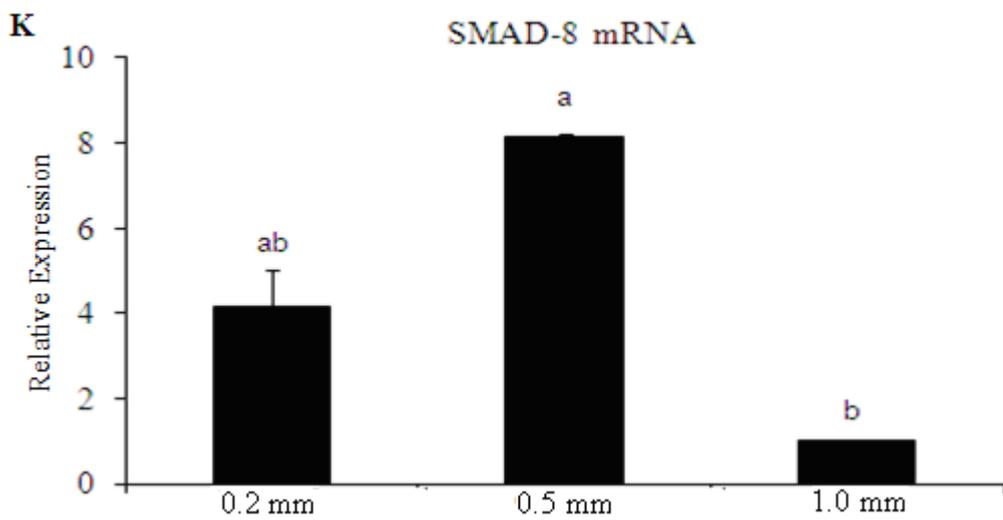
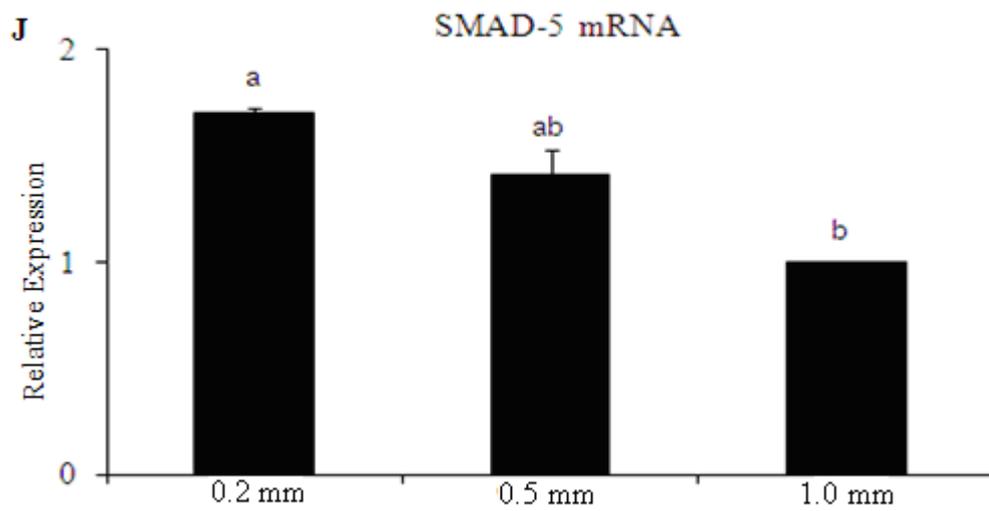
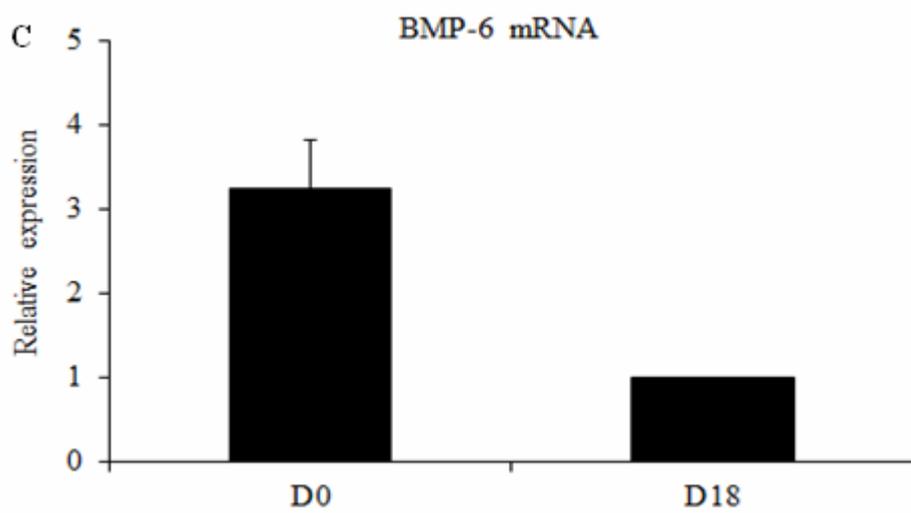
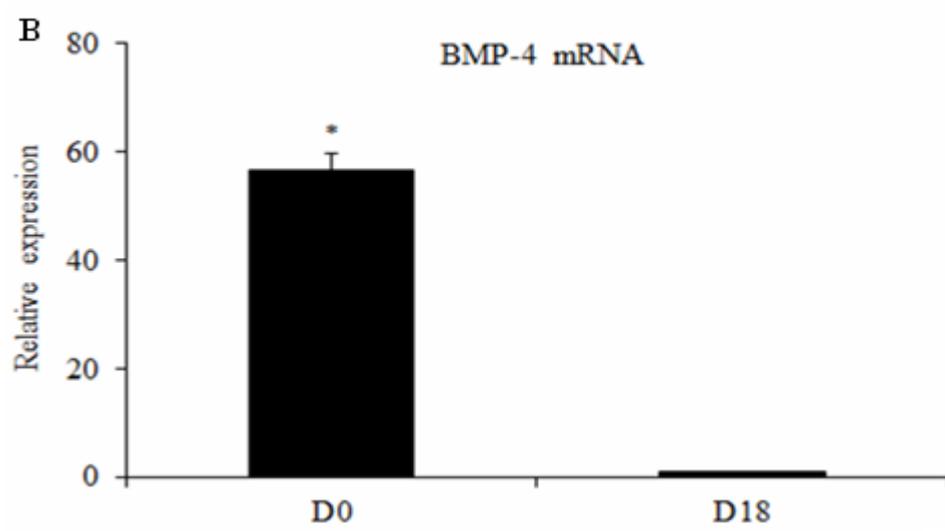
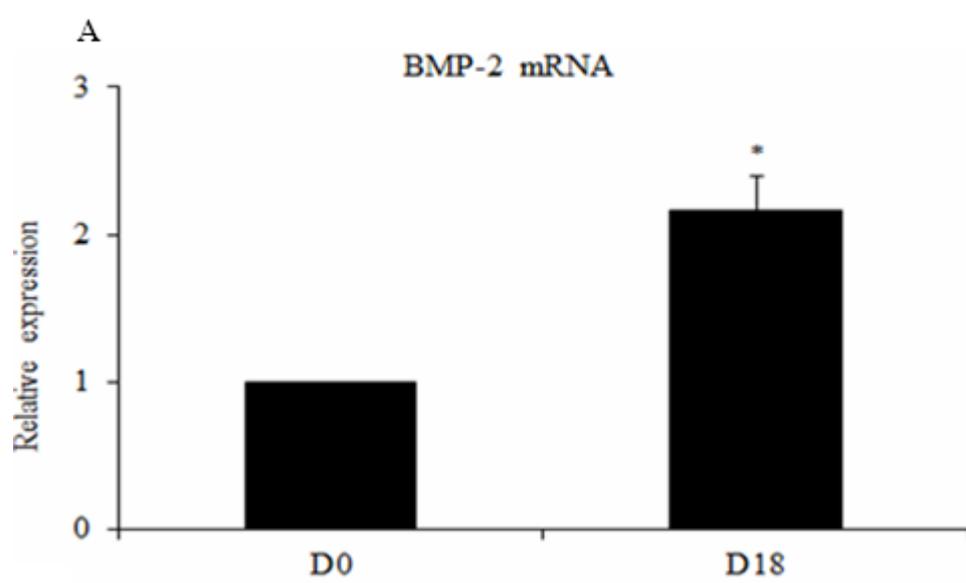
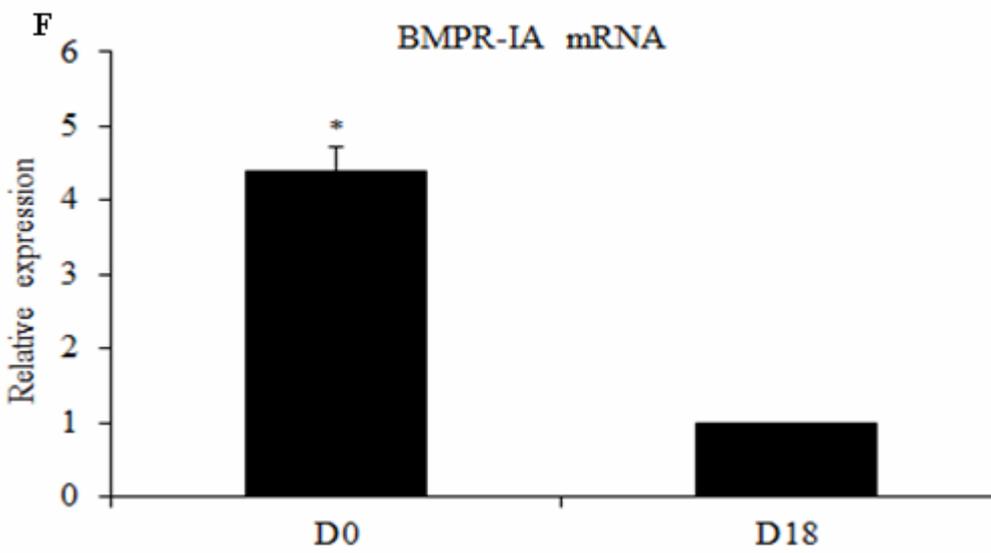
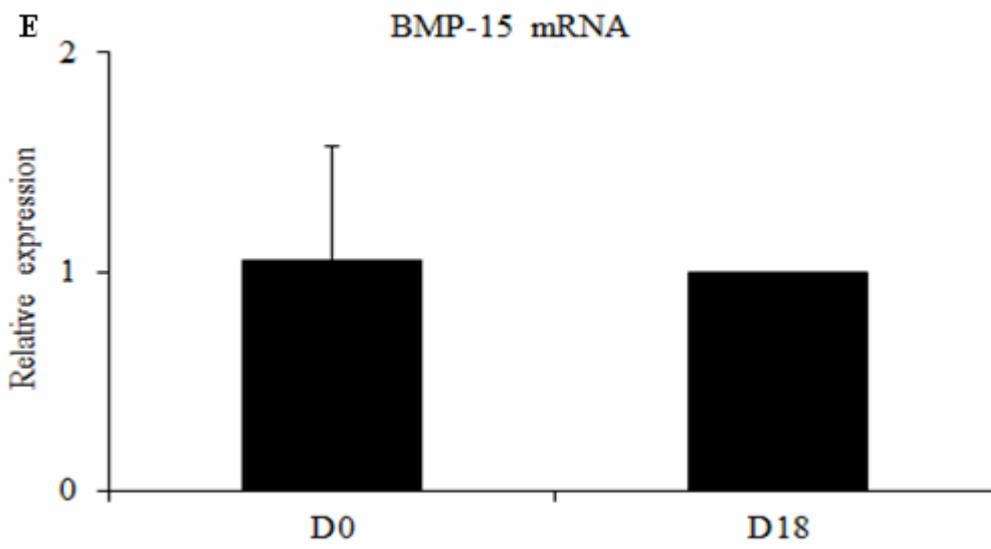
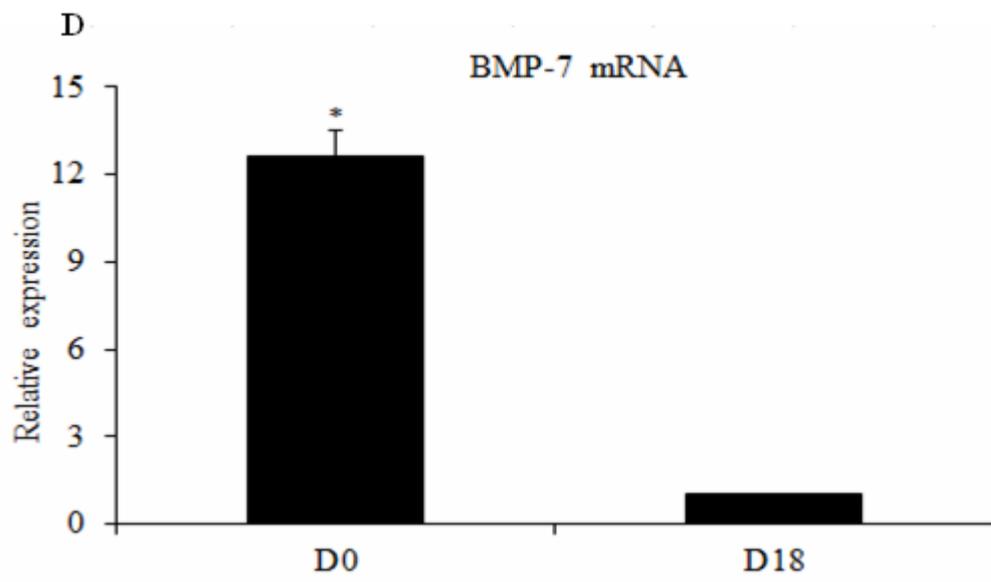
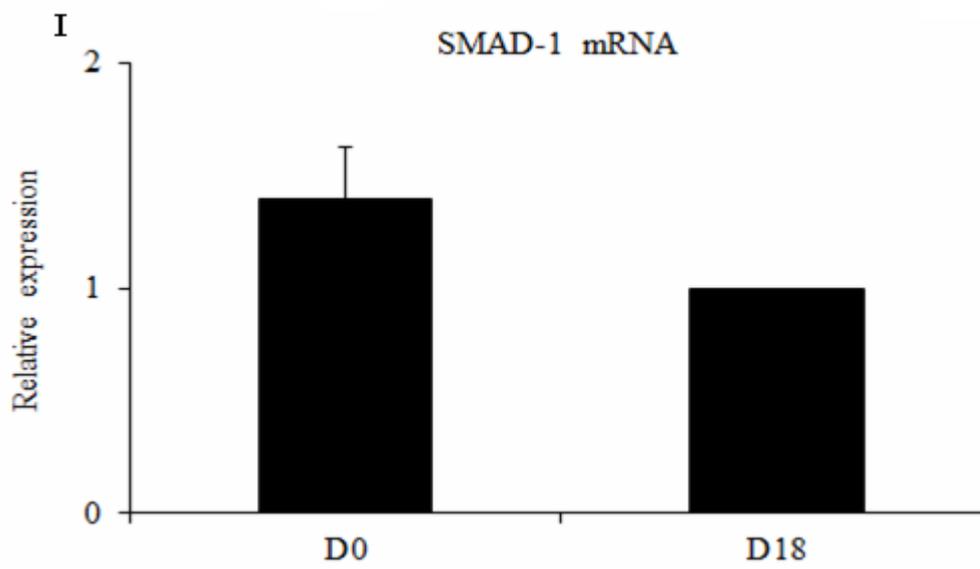
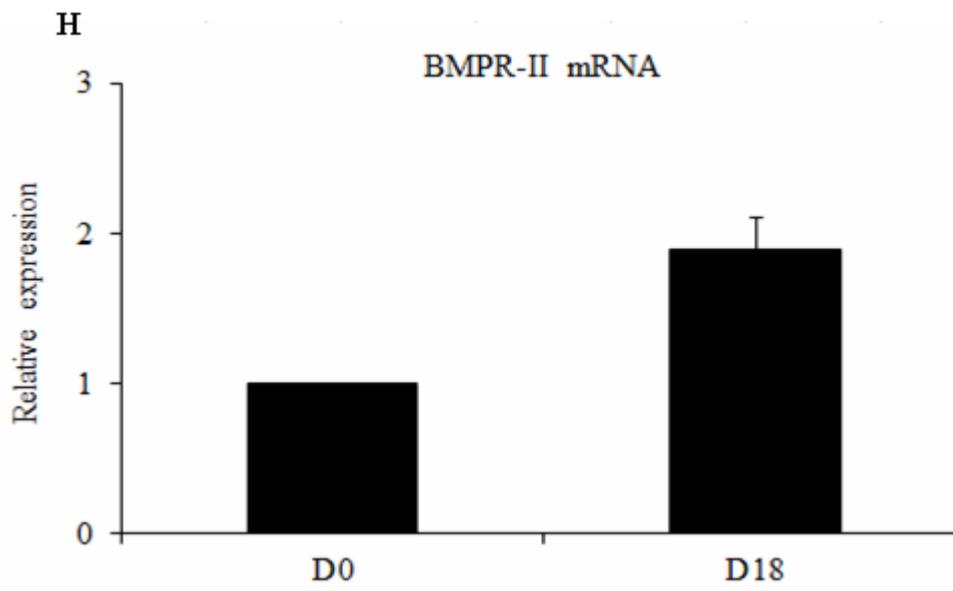
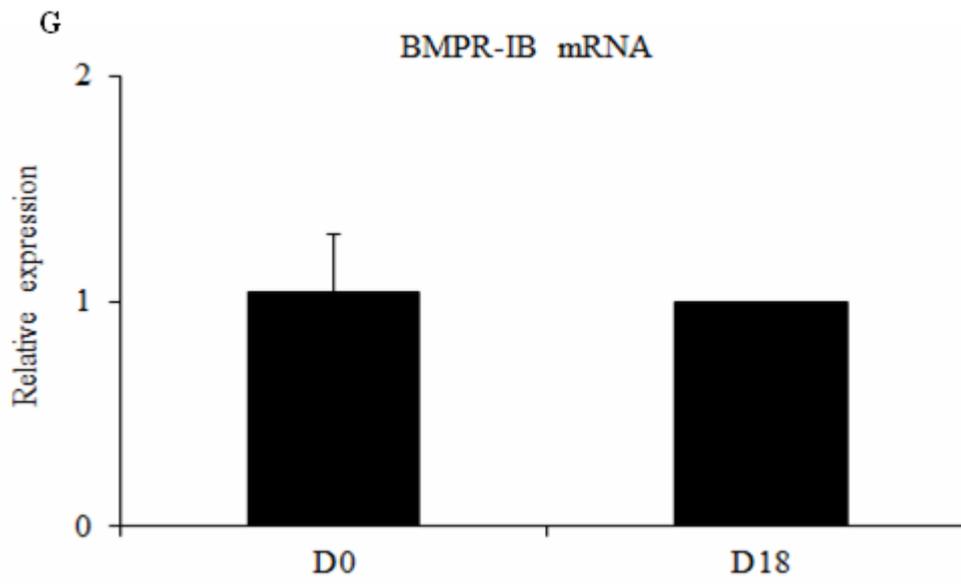


Figure 2A-K: Relative expression of mRNA for BMP-2 (A), BMP-4 (B), BMP-6 (C), BMP-7 (D), BMP-15 (E), BMPR-IA (F), BMPR-IB (G), BMPR-II (H), SMAD-1 (I), SMAD-5 (J), SMAD-8 (K), in goat follicles with a diameter of 0.2, 0.5 and 1.0 mm.

a, b: significantly different ($P < 0.05$).







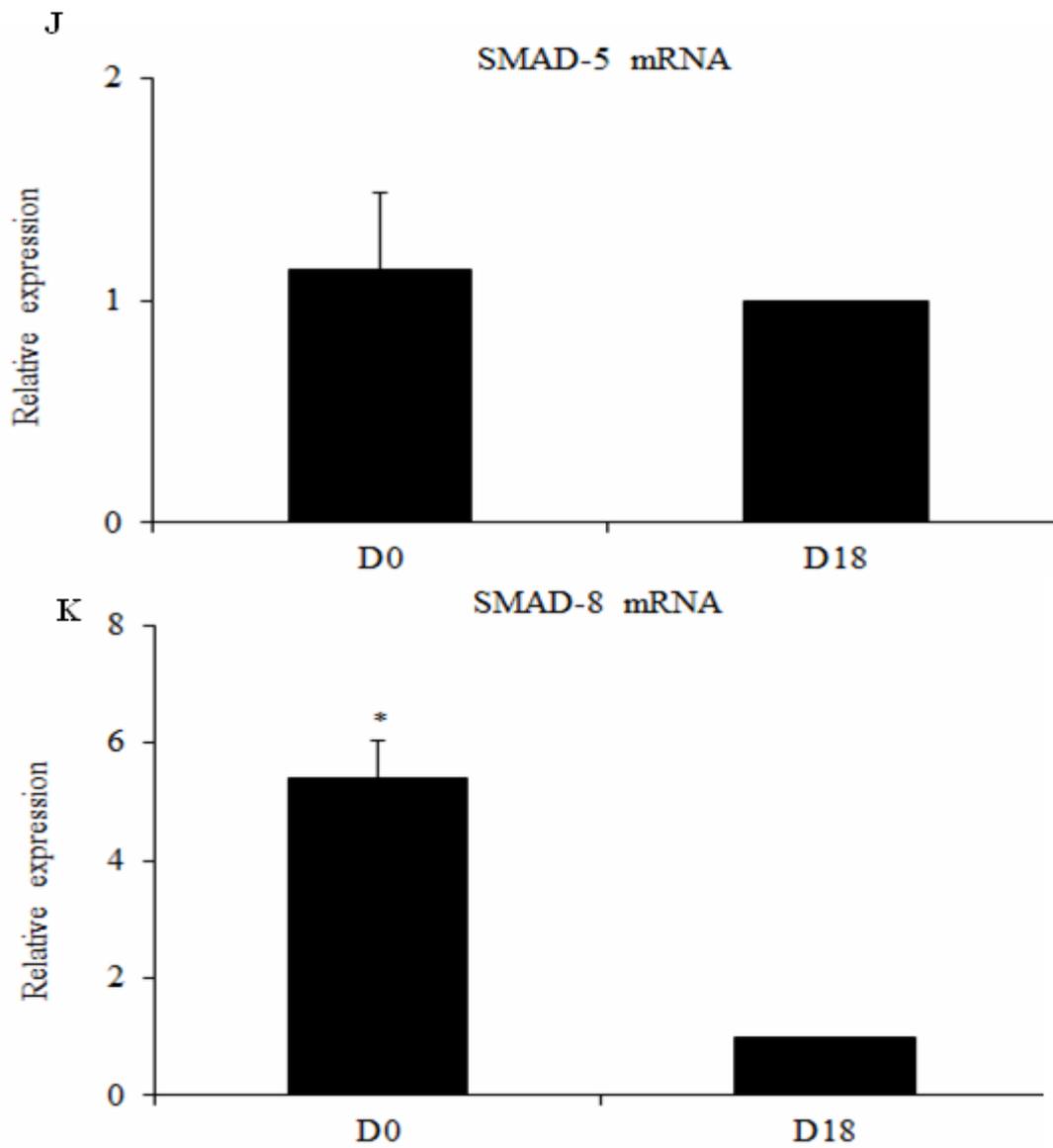


Figure 3A-K: Relative expression of mRNA for BMP-2 (A), BMP-4 (B), BMP-6 (C), BMP-7 (D), BMP-15 (E), BMPR-IA (F), BMPR-IB (G), BMPR-II (H), SMAD-1 (I), SMAD-5 (J), SMAD-8 (K), in goat follicles after their culture for 18 days.

*: significantly different ($P < 0.05$).

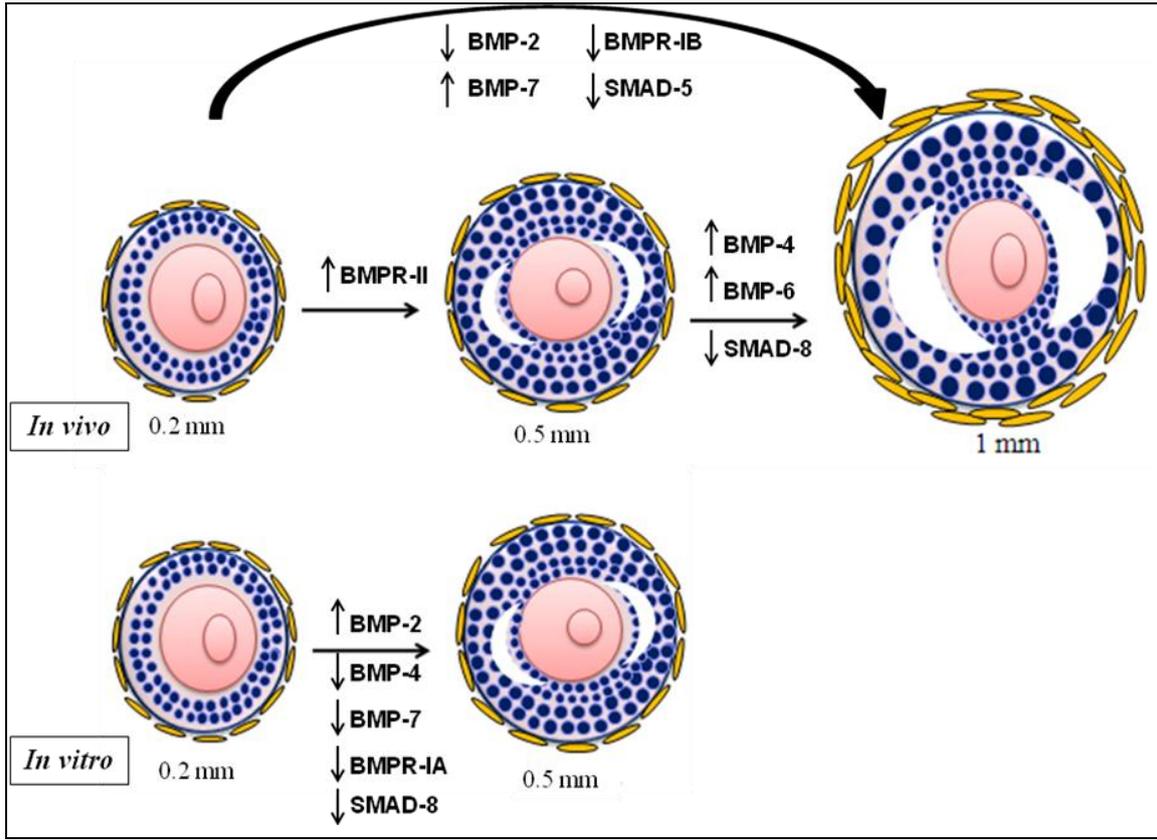


Figure 4. Schematic drawing of expression levels for BMP-system components in the different follicular categories analyzed.

5. References

- Arunakumari, G., Shanmugasundaram, N., Rao, V. H. (2010). Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*. **74**, 884-894.
- Bonnet, A., Dalbies-tran, R., Sirard, M. A. (2008). Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. *Reproduction*. **135**, 119–128.
- Campbell, B. K., Souza, C. J., Skinner, A. J., Webb, R., Baird, D. T. (2006). Enhanced response of granulosa and theca cells from sheep carriers of the FecB mutation *in vitro* to gonadotropins and bone morphogenic protein-2, -4, and -6. *Endocrinology*. **147**, 1608-1620.
- Cecconi, S., Capacchietti, G., Russo, V., Berardinelli, P., Mattioli, M., Barboni, B. (2003). *In Vitro* growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. *Biol. Reprod.* **70**, 12–17.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., Zumla, A. (2004). Validation of *housekeeping* genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*. **37**, 112-119.
- Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P., Persani, L. (2004). Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 106-111.
- Drummond, A. E., Le, M. T., Ethier, J. F., Dyson, M., Findlay, J. K. (2002). Expression and localization of activin receptors, Smads, and bglycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology*. **143**, 1423–1433.
- Elvin, J. A., Yan, C., Matzuk, M. M. (2000). Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. *Mol. Cell Endocrinol.* **159**, 1-5.

- Erickson, G. F., Shimasaki, S. (2003). The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 1-20.
- Fatehi, A. N., Van Den Hurk, R., Colenbrander, B., Daemen, A. J., Van Tol, H. T., Monteiro, R. M., Roelen, B. A., Bevers, M. M. (2005). Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP-2 and BMP-4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*. **63**, 872-889.
- Frota, I. M. A.; Leitão, C. C. F.; Costa, J. J. N.; Brito, I. R.; Van Den Hurk, R.; Silva, J. R. V. (2010). Stability of *housekeeping* genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. *Zygote*, **19**, 71-83.
- Frota, I. M. A.; Leitão, C. C. F.; Costa, J. J. N.; Van Den Hurk, R.; Saraiva, M.V.A.; Figueiredo, J.R., Silva, J. R. V. (2011) Levels of BMP-6 mRNA in goat ovarian follicles and *in vitro* effects of BMP-6 on secondary follicle development. *Zygote* (submitted).
- Garcia-Vallejo, J. J., Van Het Hof, B., Robben, J., Vanwijk, J. A. E., Van Die, I., Joziassse, D. H., Van Dijk, K. (2004). Approach for defining endogenous reference genes in gene expression experiments. *Anal. Biochem.* **329**, 293-299.
- 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**, 239-25.
- Gong, X., McGee, E. A. (2009). Smad3 is required for normal follicular follicle-stimulating hormone responsiveness in the mouse. *Biol. Reprod.* **81**, 730-738.

- Gutierrez, C. G., Ralph, J. H., Telfer, E. E., Wilmut, I., Webb, R. (2000). Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol. Reprod.* **62**, 1322-1328.
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* **70**, 900-909.
- Ho, C. C., Bernard, D. J. (2009). Bone Morphogenetic protein 2 signals via BMPRI1A to regulate murine follicle-stimulating hormone beta subunit transcription. *Biol. Reprod.* **81**, 133-141.
- Jaatinen, R., Bondestam, J., Raivio, T., Hilden, K., Dunkel, L., Groome, N., Ritvos, O. (2002). Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin b (B)-subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 1254-1261.
- Joyce, I. M., Pendola, F. L., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. (1999). Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev. Biol.* **214**, 342-353.
- Juengel, J. L., Bodensteiner, K. J., Heath, D. A., Hudson, N. L., Moeller, C. L., Smith, P., Galloway, S. M., Davis, G. H., Sawyer, H. R., McNatty, K. P. (2004). Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 447-460.
- Juengel, J. L., McNight, K. P. (2005). The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the ovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update.* **11**, 144-161.
- Kaivo-Oja, N., Jeffery, L. A., Ritvos, O., Mottershead, D. G. (2006). Smad signalling in the ovary. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **4**, 1-13.

- Knight, P. G., Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. **132**, 191–206.
- Krysko, D. V., Diez-Fraile, A., Criel, G., Svistunov, A. A., Vandenabeele, P., D'herde, K. (2008). Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis*. **13**, 1065-1087.
- 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.
- Lin, C., Spikings, E., Zhang, T., Rawson, D. (2009). *Housekeeping* genes for cryopreservation studies on zebrafish embryos and blastomeres. *Theriogenology*. **71**, 1147-1155.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **25**, 402-408.
- Magalhães, D. M., Duarte, A. B., Araújo, V. R., Brito, I. R., Soares, T. G., Lima, I. M., Lopes, C. A., Campello, C. C., Rodrigues, A. P. R., Figueiredo, J. R. (2010). *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*. **75**, 182-188.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791.
- Matsakas, A., Patel, K. (2009). Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histology and histopathol.* **24**, 209-222.
- McNatty, K. P., Juengel, J. L., Wilson, T., Galloway, S. M.; Davis, G. H., Hudson, N. L., Moeller, C. L., Cranfield, M., Reader, K. L., Laitinen, M. P., Groome, N. P., Sawyer, H. R., Ritvos, O. (2003). Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep. *Reprod. Suppl.* **61**, 339-351.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* **147**, 35-51.

Saraiva, M. V. A., Rossetto, R., Brito, I. R., Celestino, J. J. H., Silva, C. M. G., Faustino, L. R., Almeida, A. P., Bruno, J. B., Magalhães, D. M., Matos, M. H. T., Campello, C. C., Figueiredo, J. R. (2010). Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reprod. Sci.* **17**, 1135-1143.

Schmierer, B., Hill, C. S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 970–982.

Shi, J., Yoshino, O., Osuga, Y., Koga, K., Hirota, Y., Hirata, T., Yano, T., Nishii, O., Taketani, Y. (2009). Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin β subunits, and anti-Mullerian hormone in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* **92**, 1794-1798.

Shimasaki, S., Moore, R. K., Otsuka, F., Erickson, G. F. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* **25**, 72-101.

Shimasaki, S., Zachow, R. J., Li, D., Kim, H., Iemura, S., Ueno, N., Sampath, K., Chang, R. J., Erickson, G. F. (1999). A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *PNAS.* **96**, 7282–7287.

Souza, C. J., Campbell, B. K., McNeill, A. S., Baird, D. T. (2002). 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.* **123**, 363-369.

Thomas, F. H., Ethier, J. F., Shimasaki, S., Vanderhyden, B. C. (2005). Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology.* **146**, 941-949.

Van Tol, H. T. A., Van Eerdenburg, F. J. C. M., Colenbrander, B., Roelen, B. A. J. (2007). Enhancement of bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in

mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 578–587.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 34.1–34.11.

Wilson, T., Wu, X. Y., Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. A. (2001). 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.* **64**, 1225-1235.

Wu, Y-T., Tang, L., Cai, J., Lu, X. E., Xu, J., Zhu, X. M., Luo, Q., Huang, H. F. (2007b). High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum. Reprod.* **22**, 1526-1531.

7. Conclusões

- PGK e β -tubulina são os genes de referência mais estáveis em folículos caprinos de 0,2 mm, 0,5 mm e 1 mm de diâmetro;
- BMP-4, BMP-6 E BMP-7 apresentaram maiores níveis de RNAm em folículos de 1 mm, quando comparados com folículos de 0,2 mm e 0,5 mm;
- A expressão do RNAm para BMPR-IB foi maior em folículos de 0,2 mm do que em folículos de 1 mm e 0,5 mm;
- Os níveis de BMPR-II foram significativamente maiores em folículos de 0,5 mm do que em folículos de 0,2 mm e 1 mm;
- Os níveis de RNAm para SMAD-5 foram significativamente maiores em folículos de 0,2 mm do que em folículos de 0,5 mm e 1 mm;
- SMAD-8 foi significativamente mais expressa em folículos de 0,5 mm do que em folículos de 0,2 mm e 1 mm;
- A expressão BMP-15 foi significativamente maior do que BMP-7 em folículos de 0,2 e 0,5 mm.
- Em folículos de 0,5 mm, os níveis de RNAm para BMPR-IB foram significativamente maiores que BMPR-II.
- A expressão de SMAD-5 foi maior que SMAD-8 em folículos de 0,2, 0,5 e 1 mm de diâmetro;
- Os níveis de RNAm para BMP-2, após o cultivo, sofreu um aumento significativo, enquanto que observa-se uma redução de BMP-4 e BMP-7;
- Após o cultivo de folículos caprinos, foi detectado um aumento significativo nos níveis de RNAm para BMPR-IA, mas observou-se uma redução de SMAD-8.

8. Perspectivas

A quantificação do RNAm para os fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas, seus receptores e seus mensageiros intracelulares pode contribuir para demonstrar o papel das diversas substâncias que atuam na promoção do crescimento de folículos da fase pré-antral até a maturação. Desta forma, estudos posteriores são necessários para a completa elucidação da biologia molecular e fisiologia do ovário.

9. Referências bibliográficas

- ABIR, R.; GAROR, R.; FELZ, C.; NITKE, S.; KRISSE, H.; FISCH, B. Growth hormone and its receptor in human ovaries from fetuses and adults. **Fertil. Steril.**, v. 90, p. 1333-1339, 2008.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res.**, v. 64, p. 5245-5250, 2004.
- ANSTAETT, O. L.; BROWNLIE, J.; COLLINS, M. E.; THOMAS, C. L. Validation of endogenous reference genes for RT-qPCR normalization in bovine lymphoid cells (BL-3) infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Vet. Immunol.* **Immunopathol.**, v. 137, p. 201-207, 2010.
- ARTINI, P. G.; MONTELEONE, P.; TOLDIN, M. R. P.; MATTEUCCI, C.; RUGGIERO, M.; CELA, V.; GENAZZANI, A. R. Growth factors and folliculogenesis in polycystic ovary patients. **Expert. Rev. Endocrinol. Metab.**, v. 2, p. 215–217, 2007.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74(5), p. 884-894, 2010.
- ATTISANO, L.; WRANA, J. L.; MONTALVO, E.; MASSAGUÉ, J. Activation of signalling by the activin receptor complex. **Mol. Cell Biol.**, v. 16, p. 1066–1073, 1996.
- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. de. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003. 211 p.
- BANDA, M.; BOMMINENI, A.; THOMAS, R. A.; LUCKINBILL, L. S.; TUCKER, J. D. Evaluation and validation of *housekeeping* genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Mut. Res./Gen. Tox. and Environm. Mut.**, v. 649, p. 126-134, 2007.

BARBER, R. D.; HARMER, D. W.; COLEMAN, R. A.; CLARK, B. J. GAPDH as a *housekeeping* gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiol. Genomics**, v. 21, p. 389-395, 2005.

BAUER, H.; LELE, Z.; RAUCH, G. J.; GEISLER, R.; HAMMERSCHMIDT, M. The type I serine/threonine kinase receptor Alk8/Lost-a-fin is required for Bmp2b/7 signal transduction during dorsoventral patterning of the *zebrafish* embryo. **Development**, v. 128, p. 849–858, 2001.

BERNARD, P. S.; WITTEWER, C. T. Real-Time PCR technology for cancer diagnostics. **Clin. Chem.**, v. 48:8, p. 1178–1185, 2002.

BILODEAU-GOESEELS, S.; SCHULTZ, G. A. Changes in ribosomal ribonucleid acid within in vitro-produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 1323-1329, 1997.

BINNECK E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biotechnol. Ciência e Desenvol.**, v. 32, p. 28-37, 2004.

BONNET, A.; DALBIES-TRAN, R.; SIRARD, M. A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**, v. 135, p. 119–128, 2008.

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. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 29(4), p. 593-604, 2005.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 365p.

BRUCE, A.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RASS, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Molecular: Uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. 757p.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, **J. Mol. Endocrinol.**, v. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 29, p. 23–39, 2002.

BUSTIN, S. A.; GYSELMAN, V. G.; WILLIAMS, N. S.; DORUDI, S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. **British J. Cancer**, v. 79, p. 1813-1820, 1999.

BUSTIN, S. A.; MCKAY, I. A. The product of the primary response gene BRF1 inhibits the interaction between 14-3-3 proteins and cRaf-1 in the yeast trihybrid system. **DNA and Cell Biol.**, v. 18, p. 653-661, 1999.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **J. Biomol. Techniques**, v. 15(3), p. 155-166, 2004.

CALE, J. M.; MILLICAN, D. S.; ITOH, H.; MAGNESS, R. R.; BIRD, I. M. Pregnancy induces an increase in the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in uterine artery endothelial cells. **J. Society Gynecol. Investig.**, v. 4, p. 284-292, 1997.

CALLIS, J.; VIERSTRA, R. D. Ubiquitin and ubiquitin genes in higher plants. **Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 1-30, 1989.

CALVO, E. L.; BOUCHER, C.; COULOMBE, Z.; MORISSET, J. Pancreatic GAPDH gene expression during ontogeny and acute pancreatitis induced by caerulein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, p. 636-640, 1997.

CAMPBELL, B. K.; SOUZA, C. J.; SKINNER, A. J.; WEBB, R.; BAIRD, D. T. Enhanced response of granulosa and theca cells from sheep carriers of the FecB mutation in vitro to gonadotropins and bone morphogenic protein-2, -4, and -6. **Endocrinology**, v. 147, p. 1608-1620, 2006.

CARROLL, J.; WHITINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **J. Reprod. Fertil.**, v. 90, p. 321-327, 1990.

CECCONI, S.; CAPACCHIETTI, G.; RUSSO, V.; BERARDINELLI, P.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. In Vitro Growth of Preantral Follicles Isolated from Cryopreserved Ovine Ovarian Tissue. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 12-17, 2003.

CHAN, Y. L.; SUZUKI, K.; WOOL, I. G. The carboxyl extensions of two rat ubiquitin fusion proteins are ribosomal proteins S27a and L40. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 215, p. 682-690, 1995.

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

CHILDS, A. J.; KINNELL, H. L.; COLLINS, C. S.; HOGG, K.; BAYNE, R. A. L.; GREEN, S. J.; McNEILLY, A. S.; ANDERSON, R. A. BMP signalling in the human fetal ovary is developmentally-regulated and promotes primordial germ cell apoptosis. In: **Abstracts of the 26th Annual Meeting of ESHRE**, 2010, Rome, Italy.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Mol. Biol.**, v. 18, p. 675-689, 1992.

CHUANG, D. M.; HOUGH, C.; SENATOROV, V. V. “Glyceradldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases”. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 269–290, 2005.

COHEN-SOLAL, MICHEL.; VALENTIN, C.; PLASSA, F.; GUILLEMIN, G.; DANZE, F.; JAISSON, F.; ROSA, R. Identification of New Mutations in Two Phosphoglycerate Kinase (PGK) Variants Expressing Different Clinical Syndromes: PGK CrC teil and PGK Amiens. **Blood**, v. 84, p. 898-903, 1994.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. *In vitro* Follicle Growth: Achievements in Mammalian Species. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 36, p. 3-9, 2001.

CUNNINGHAM, N. S.; JENKINS, N. A.; GILBERT, D. J.; COPELAND, N. G.; REDDI, A. H.; LEE, S. J. Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3. **Growth Factors**, v. 12, p. 99–109, 1995.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K.; SCHEIBLE, W. R. Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, v. 139, p. 5-17, 2005.

- DEINDL, E.; BOENGLER, K.; VAN ROYEN, N.; SCHAPER, W. Differential expression of *GAPDH* and beta3-actin in growing collateral arteries. **Mol. Cell Biochem.**, v. 236, p. 139–146, 2002.
- DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, C.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v. 130, p. 147-157, 2005.
- DERYNCK, R.; GELBART, W. M.; HARLAND, R. M.; HELDIN, C. H.; KERN, S. E.; MASSAGUÉ, J.; MELTON, D. A.; MLODZIK, M.; PADGETT, R. W.; ROBERTS, A. B.; SMITH, J.; THOMSEN, G. H.; VOGELSTEIN, B.; WANG, X. F. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF- β family signals. **Cell**, v. 87, p. 173, 1996.
- DHEDA, K.; HUGGETT, J. F.; BUSTIN, S. A.; JOHNSON, M. A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of *housekeeping* genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **BioTechniques**, v. 37, p. 112-119, 2004.
- DI PASQUALE, E.; BECK-PECCOZ, P.; PERSANI, L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 75, p. 106-111, 2004.
- DRUMMOND, A. E.; LE, M. T.; ETHIER, J. F.; DYSON, M.; FINDLAY, J. K. Expression and localization of activin receptors, Smads, and heparan sulfate to the postnatal rat ovary. **Endocrinology**, v. 143, p. 1423–1433, 2002.
- DYDENSBORG, A. B.; HERRING, E.; AUCLAIR, J.; TREMBLAY, E.; BEAULIEU, J-F. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 290, p. G1067–G1074, 2006.
- EDASHIGE, K.; SAKAMOTO, M.; KASAI, M. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. **Cryobiology**, v. 40(2), p. 171-175, 2000.
- EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endoc. Rev.**, v. 30(6), p. 624–712, 2009.

EDWARDS, D. R.; DENHARDT, D. T. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, vol. 157, p. 127-143, 1985.

EDWARDS, S. J.; READER, K. L.; LUN, S.; WESTERN, A.; LAWRENCE, S.; McNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L. The Cooperative Effect of Growth and Differentiation Factor-9 and Bone Morphogenetic Protein (BMP)-15 on Granulosa Cell Function is Modulated Primarily through BMP Receptor II. **Endocrinology**, v. 149, p. 1026–1030, 2008.

EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. **Genetics**, v. 175, p. 477–485, 2007.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 159, p. 1–5, 2000.

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

FAHRENKRUG, S. C.; SMITH, T. P. I.; FREKING, B. A.; CHO, J.; WHITE, J.; VALLET, J.; WISE, T.; ROHER, G.; PERTEA, G.; SULTANA, R.; QUACHENBUSH, J.; KEELE, J. W. Porcine gene discovery normalized cDNA-library sequencing and EST cluster assembly. **Mammal. Gen.**, v. 13, p. 475-478, 2002.

FATEHI, A. N.; VAN DEN HURK, R.; COLENBRANDER, B.; DAEMEN, A. J.; VAN TOL, H. T.; MONTEIRO, R. M.; ROELEN, B. A.; BEVERS, M. M. Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP-2 and BMP-4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 63, p. 872–889, 2005.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais - MOIFOPA. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Varela, 2003, p. 227-260.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª edição, 2008, cap 16, p. 303–327.

FOY, C. A.; PARKES, H. C. Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. **Clin. Chem.**, v. 47, p. 990–1000, 2001.

FRANK, S.; STARK, J.; HARDY, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 367–378, 2008.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, v. 26, p. 112–125, 1999.

FROTA, I. M. A.; LEITÃO, C. C. F.; COSTA, J. J. N.; BRITO, I. R.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J. R. V. Stability of *housekeeping* genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. **Zygote**, v. 19, p. 71-83, 2010.

FROTA, I. M. A. **Estabilidade de Genes de Referência e Influência das Proteínas Morfogenéticas Ósseas 6 E 7 sobre o Desenvolvimento In Vitro de Folículos Pré-Antrais Caprinos**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia (PPGB), Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, Ce.

FU, J.; LIHONG, B.; LI, Z.; ZHOUHUAN, D.; XIN, G.; HAOFEI, L.; YUNJUAN, S.; HAIFENG, S. Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 42, p. 568-574, 2010.

GALIVETI, C. R.; ROZHDESTVENSKY, T. S.; BROSIUS, J.; LEHRACH, H.; KONTHUR, Z. Application of *housekeeping* npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptoma by real-time PCR. **RNA**, v. 16, p. 450–461, 2010.

GALLOWAY, S. M.; McNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; McLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genet.**, v. 25, p. 279-283, 2000.

GARCIA-CRESPO, D.; JUSTE, R. A.; HURTADO, A. Correction: Selection of ovine *housekeeping* genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. **Bio. Med. Central Vet. Res.**, v. 48, p. 2-26, 2006.

GARCIA-VALLEJO, J. J.; VAN HET HOF, B.; ROBBEN, J.; VANWIJK, J. A. E.; VAN DIE, I.; JOZIASSE, D. H. & VAN DIJK, K. Approach for defining endogenous reference genes in gene expression experiments. **Anal. Biochem.**, v. 329, p. 293-299, 2004.

GAYTA, F.; GAYTA, M.; CASTELLANO, J. M.; ROMERO, M.; ROA, J.; APARICIO, B.; GARRIDO, N.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; MILLAR, R. P.; PELLICER, A.; FRASER, H. M.; TENA-SEMPERE, M. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, p. E520–E531, 2009.

GERVAIS, A. L.; MARQUES, M.; GAUDREAU, L. PCR Tiler: automated design of tiled and specific PCR primer pairs. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. 308-312, 2010.

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.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 31, p. 212-217, 2007.

GONG, X.; MCGEE, E. A. Smad3 Is Required for Normal Follicular Follicle-Stimulating Hormone Responsiveness in the Mouse. **Biol. Reprod.**, v. 81, p. 730–738, 2009.

GOSDEN, R. G.; BOLAND, N. I.; SPEARS, N.; MURRAY, A. A.; CHAPMAN, M.; WADE, J. C.; ZOHDY, N. I. The biology and technology of follicular oocyte development *in vitro*. **Reprod. Med. Rev.**, v. 2, p. 29-152, 1993.

GUÉNIN, S.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BELLINI, C.; GUTIERREZ, L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **J. Experim. Bot.**, v. 60, p. 487-493, 2009.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

HAHN, S. A.; SCHUTTE, M.; HOQUE, A. T.; MOSKALUK, C. A.; COSTA, L. T.; ROZENBLUM, E.; WEINSTEIN, C. L.; FISCHER, A.; YEO, C. J.; HRUBAN, R. H.; KERN, S. E. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18. **Science**, v. 271, p. 350–353, 1996.

HAMALAINEN, H. K.; TUBMAN, J. C.; VIKMAN, S.; KYROLA, T.; YLIKOSKI, E.; WARRINGTON, J. A.; LAHESMAA, R. Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RTPCR. **Anal. Biochem.**, v. 299, p. 63–70, 2001.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 900–909, 2004.

HE, J. Q.; SANDFORD, A. J.; WANG, I. M.; STEPANIANTS, S.; KNIGHT, D. A.; KICIC, A.; STICK, E. S. M.; PARÉ, P. D. Selection of *housekeeping* genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. **Eur. Respir. J.**, v. 32, p.755-762, 2008.

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

HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; SHIMADA, M.; WAYNE, C. M.; OCHSNER, S. A.; WHITE, L.; RICHARDS, J. S. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? **Mol. Endocrinol.**, v. 20, p. 1300–1321, 2006.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system for protein degradation. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 761-807, 1992.

HO, C. C.; BERNARD, D. J. Bone Morphogenetic Protein 2 Signals via BMPRI1A to Regulate Murine Follicle-Stimulating Hormone Beta Subunit Transcription. **Biol. Reprod.**, v. 81, p. 133–141, 2009.

HOCQUETTE, J. F. Where are we in genomics? **J. Physiol. and Pharmac.**, v. 56(3), p. 37-70, 2005.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 88, p. 7276–7280, 1991.

HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; CONTI, M. Epidermal Growth Factor-Like Growth Factors in the Follicular Fluid: Role in Oocyte Development and Maturation. **Semin. Reprod. Med.**, v. 27, p. 52–61, 2009.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Genes Immun.**, v. 6, p. 279–284, 2005.

INAGAKI, K.; OTSUKA, F.; MIYOSHI, T.; YAMASHITA, M.; TAKAHASHI, M.; GOTO, J.; SUZUKI, J.; MAKINO, H. p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulated Steroidogenesis in Granulosa Cell-Oocyte Cocultures: Role of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4. **Endocrinology**, v. 150(4), p. 1921–1930, 2009.

JAATINEN, R.; BONDESTAM, J.; RAIVIO, T.; HILDEN, K.; DUNKEL, L.; GROOME, N.; RITVOS, O. Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin beta (B) - subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 1254–1261, 2002.

JIANG, J.; LEE, E. J.; GUSEV, Y.; SCHMITTGEN, T. D. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. 5394–5403, 2005.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Dev. Biol.**, v. 214, p. 342-353, 1999.

JUENGEL, J. L.; BODENSTEINER, K. J.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; SAWYER, H. R.; MCNATTY, K. P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 447-460, 2004.

JUENGEL, J. L.; HEATH, D. A.; QUIRKE, L. D.; MCNATTY, K. P. O estrogen receptor α and β , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. **Reprod. Fertil.**, v.131, p. 81-92, 2006b.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1777-1789, 2002.

JUENGEL, J. L.; MCNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Hum. Reprod. Update**, v. 11, p. 143-160, 2005.

JUENGEL, 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.

KAIVO-OJA, N.; JEFFERY, L. A.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D. G. Smad signalling in the ovary. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 4, p. 1-13, 2006.

KAMPHUIS, W.; SCHNEEMANN, A.; VAN BEEK, L. M.; SMIT, A. B.; HOYNG, P. F.; KOYA, E. Prostanoid receptor gene expression profile in human trabecular meshwork: a quantitative real-time PCR approach. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 42, p. 3209–3215, 2001.

KAWABATA, M.; IMAMURA, T.; MIYAZONO, K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 9, p. 49–61, 1998.

KAYAMORI, T.; KOSAKA, N.; MIYAMOTO, A.; SHIMIZU, T. The differential pathways of bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 in the suppression of the bovine granulosa cell apoptosis. **Mol. Cell Biochem.**, v. 323, p. 161–168, 2009.

KAYANI, A.R.; GLISTER, C.; KNIGHT, P. G. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular–luteal transition in cattle. **Reproduction**, v. 137, p. 67–78, 2009.

KENDALL, L. V.; BESSELSSEN, D. G.; RILEY, L. K. Fluorogenic 5' Nuclease PCR (Real Time PCR). **Contemp. Topics in Lab. Anim. Sci.**, v. 39, p. 47-58, 2000.

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

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. 2006. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191–206, 2006.

KRYSKO, D. V.; DIEZ-FRAILE, A.; CRIEL, G.; SVISTUNOV, A. A.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. **Apoptosis**, v. 13, p. 1065-1087, 2008.

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 Dev.**, v. 13, p. 424–436, 1999.

LEE, K. B.; KHIVANSARA, V.; SANTOS, M. M.; LAMBA, P.; YUEN, T.; SEALFON, S. C.; BERNARD, D. J. Bone morphogenetic protein 2 and activin A synergistically stimulate follicle-stimulating hormone beta subunit transcription. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 38, p. 315–330, 2007.

LEE, W. S.; OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; 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. K.; 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.

LEE, W-I.; KANTARJIAN, H.; GLASSMAN, A.; TALPAZ, M.; LEE, M-S. Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction. **Annals Onc.**, v. 13, p. 781-788, 2002.

LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R. V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Sci. Vet.**, v. 37(3), p. 215-224, 2009.

- LEMBONG, J. M. A.; YAKOBY, N.; SHVARTSMAN, S. Y. Spatial Regulation of BMP Signaling by Patterned Receptor Expression. **Tissue Engineer.**, v. 14, p. 1469-1477, 2008.
- LI, H.; DAI, K.; TANG, T.; ZHANG, X.; YAN, M.; LOU, J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 356(4), p. 836-42, 2007.
- LI, Q.; RAJANAHALLY, S.; EDSON, M.; MATZUK, M. M. Stable expression and characterization of N-terminal tagged recombinant human bone morphogenetic protein 15. **Mol. Human. Reprod.**, v. 15, n.12, p. 779-788, 2009.
- LIN, C.; SPIKINGS, E.; ZHANG, T.; RAWSON, D. *Housekeeping* genes for cryopreservation studies on zebrafish embryos and blastomeres. **Theriogenology**, v. 71, p. 1147-1155, 2009.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **25**, 402-408.
- MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182-188, 2010.
- MANDELKOW, E. M.; MANDELKOW, E. α/β -tubulin. In: KREIS, T.; VALE, R. (eds), **Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins**. Oxford University Press, Oxford, UK. p. 127–130, 1993.
- MANSUR, N. R.; MEYER-SIEGLER, K.; WURZER, J. C.; SIROVER, M A. Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells. **Nucl. Acid. Res.**, v. 25, p. 21-28, 1993.
- MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v. 123, p. 23-30, 2002.
- MASSAGUÉ, J. How cells read TGF- β signals. **Nature Rev.**, v. 1, p. 169-178, 2000.
- MASSAGUÉ, J. TGF- β signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 753–791, 1998.

MASSAGUÉ, J.; CHEN, Y. G. Controlling TGF- β signaling. **Genes Dev.**, v. 14, p. 627-644, 2000.

MASSAGUÉ, J.; SEOANE, J.; WOTTON, D. Smad transcription factors. **Genes Development**, v. 19, p. 2783–2810, 2005.

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

MCINTOSH, C. J.; LUN, S.; LAWRENCE, S.; WESTERN, A. H.; MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L. The proregion of mouse BMP15 regulates the cooperative interactions of BMP15 and GDF9. **Biol. Reprod.**, v. 79, p. 889–896, 2008.

MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 cooperate to regulate granulosa cell function. **Reproduction**, v. 129, p. 473–480, 2005.

MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; WILSON, T.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; HUDSON, N. L.; MOELLER, C. L.; CRANFIELD, M.; READER, K. L.; LAITINEN, M. P.; GROOME, N. P.; SAWYER, H. R.; RITVOS, O. Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep. **Reprod. Suppl.**, v. 61, p. 339-351, 2003.

MEYER-SIEGLER, K.; MAURO, D. J.; SEAL, G.; WURZER, J.; DERIEL, J. K.; SIROVER, M. A. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 88, p. 8460–8464, 1991.

MIYAZONO, K.; KAMIYA, Y.; MORIKAWA, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. **J. Biochem.**, v. 147(1), p. 35-51, 2010.

MIYOSHI, T.; OTSUKA, F.; SUZUKI, J.; TAKEDA, M.; INAGAKI, K.; KANO, Y.; OTANI, H.; MIMURA, Y.; OGURA, T.; MAKINO, H. Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. **Biol. Reprod.**, v. 74, p. 1073–1082, 2006.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, 480p.

MORRISON, T. B.; MA, Y.; WEIS, J. H.; WEIS, J. J. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 987-992, 1999.

MULSANT, P.; LECERF, F.; FABRE, S.; SCHIBLER, L.; MONGET, P.; LANNELUC, I.; PISSELET, C.; RIQUET, J.; MONNIAUX, D.; CALLEBAUT, I.; CRIBIU, E.; THIMONIERI, J.; TEYSSIERI, J.; BODIN, L.; COGNIE, Y.; CHITOUR, N.; ELSEN, J-M. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. **PNAS**, v. 98, n. 9, p. 5104–5109, 2001.

NICOL, L.; FAURE, M-O.; MCNEILLY, J. R.; FONTAINE, J.; TARAGNAT, C.; MCNEILLY, A. S. Bone morphogenetic protein-4 interacts with activin and GnRH to modulate gonadotrophin secretion in L β T2 gonadotrophs. **J. Endocrinol.**, v. 196, p. 497-507, 2008.

NICOT, N.; HAUSMAN, J-F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. *Housekeeping* gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **J. Experim. Bot.**, v. 56, p. 2907-2914, 2005.

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

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 1559–1582, 2006.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotechnol. Ciência & Desenvolv.**, v. 33, p. 10-13, 2004.

NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P. M.; DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811-821, 1993.

OHTA, Y.; NAKAGAWA, K.; IMAI, Y.; KATAGIRI, T.; KOIKE, T.; TAKAOKA, K. Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26(5), p. 478-84, 2008.

OKAZAKI, K.; OKAYAMA, H.; NIWA, O. The polyubiquitin gene is essential for meiosis in fission yeast. **Exp. Cell Res.**, v. 254, p. 143-152, 2000.

OTALA, M.; ERKKILA, K.; TUURI, T.; SJÖBERG, J.; SOUMALAINEN, L.; SUIKKARI, A. M.; PENTIKÄINEN, V.; DUNKEL, L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. **Hum. Reprod.**, v. 8, p. 228-236, 2002.

OTSUKA, F.; MOORE, K. R.; SHIMASAKI, S. Biological function and cellular mechanisms of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 32889-32895, 2001.

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, p. 8060-8065, 2002.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 39523-39528, 2000.

PABLA, S. S.; PABLA, S. S. Real-Time Polymerase Chain Reaction A Revolution in Diagnostics. **Resonance**, p. 369-377, 2008.

PADHY, N.; SATHYA, M. L.; VARMA, T. R. Antral follicle size in the down regulated cycle and its relation to in vitro fertilization outcome. **J. Hum. Reprod. Sci.**, v. 2, p. 68-71, 2009.

PATTERSON, R. L.; VAN ROSSUM, D. B.; KAPLIN, A. I.; BARROW, R. K.; SNYDER, S. H. Inositol 1,4,5- trisphosphate receptor/GAPDH complex augments Ca²⁺ release via locally derived NADH. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, p. 1357-1359, 2005.

PAULE, M. R.; WHITE, R. J. Transcription by RNA Polymerases I and III. **Nuc. Acids Res.**, v. 28, p. 1283-1298, 2000.

PETERS, I. R.; HELPS, C. R.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Real-time RT-PCR: Considerations for efficient and sensitive assay design. **J. Immunol. Methods**, v. 286, p. 203-217, 2004.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable *housekeeping* genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, p. 509–515, 2004.

PIERRE, A.; PISSELET, C.; DUPONT, J.; MANDON-PÉPIN, B.; MONNIAUX, D.; MONGET, P.; FABRE, S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 33, p. 805–817, 2004.

POHJANVIRTA, R.; NIITYNEN, M.; LINDÉN, J.; BOUTROS, P. C.; MOFFAT, I. D.; OKEY, A. B. Evaluation of various *housekeeping* genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. **Chemico-Biol. Interact.**, v. 160, p. 134–149, 2006.

PUISSANT, C.; BAYAT-SARMADI, M.; DEVINOY, E.; HOUDEBINE, L. M. Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy–lactation–weaning cycle and in cultured mammary cells. A comparison with the other major milk protein mRNAs. **Europ. J. Endocrinol.**, v. 130, p. 522–529, 1994.

QIAO, J.; FENG, H. L. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. **Hum. Reprod. Update**, v.17, p. 17–33, 2010.

RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I. M.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative realtime PCR. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 313, p. 856–862, 2004.

REDDI, A. H. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 8, p. 11–20, 1997.

ROBERT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; PRAVETONI, M.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M. A. Quantification of *housekeeping* transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1465–1472, 2002.

ROBERT, D. B.; HARMER, D. W.; COLEMAN, R. A.; CLARK, B. J. GAPDH as a *housekeeping* gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiol. Gen.**, v. 21, p. 389-395, 2005.

ROBINSON, T. L.; SUTHERLAND, I. A.; SUTHERLAND, J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, v. 115, p. 160–165, 2007.

RODMAN, T. C.; BACHVAROVA, R. RNA synthesis in preovulatory mouse oocytes. **J. Cell Biol.**, v. 70, p. 251-257, 1976.

SAMAD, T. A.; REBBAPRAGADA, A.; BELL, E.; ZHANG, Y.; SIDIS, Y.; JEONG, S. J.; CAMPAGNA, J. A.; PERUSINI, S.; FABRIZIO, D. A.; SCHNEYER, A. L.; LIN, H. Y.; BRIVANLOU, A. H.; ATTISANO, L.; WOOLF, C. J. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 14122-14129, 2005.

SÁNCHEZ, F.; ADRIAENSSENS, T.; ROMERO, S.; SMITZ, J. Quantification of oocyte-specific transcripts in follicle-enclosed oocytes during antral development and maturation in vitro. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 15, n. 9, p. 539–550, 2009.

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. **Reprod. Sci.**, v. 17, p. 1135-1143, 2010.

SAVAGE, C.; DAS, P.; FINELLI, A. L.; TOWNSEND, S. R.; SUN, C. Y.; BAIRD, S. E.; PADGETT, R. W. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor- β pathway components. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, p. 790–794, 1996.

SCHMID, H.; COHEN, C. D.; HENGER, A.; IRRGANG, S.; SCHLONDORFF, D.; KRETZLER, M. Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. **Kidney Int.**, v. 64, p. 356-360, 2003.

SCHMIERER, B.; HILL, C. S. TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 970–982, 2007.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on *housekeeping* gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 46, p. 69-81, 2000.

SCHNERR, H.; NIESSEN, L.; VOGEL, R. F. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler-PCR using SYBRGreen I for continuous fluorescence monitoring. **Intern. J. Food Microbiol.**, v. 71, p. 53-61, 2001.

SCHWARTZ, N. B. Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. In: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Editores: Conn P. M., Freeman M. E., New Jersey: **Human Press**, p. 135–146, 2000.

SCULLY, K.; ROSENFELD, M. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. **Science**, v. 295, p. 2231–2235, 2002.

SEKELSKY, J. J.; NEWFELD, S. J.; RAFTERY, L. A.; CHARTOFF, E. H.; GELBART, W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 139, p. 1347–1358, 1995.

SELVEY, S.; THOMPSON, E. W.; MATTHAEI, K.; LEA, R. A.; IRVING, M. G.; GRIFFITHS, L. R. Beta-actin-an unsuitable internal control for RT-PCR. **Mol. Cell Probes**, vol. 15, p. 307-311, 2001.

SHEN, Y.; LI, Y.; YE, F.; WANG, F.; LU, W.; XIE, X. Identification of suitable reference genes for measurement of gene expression in human cervical tissues. **Anal. Biochem.**, v. 405, p. 224-229, 2010.

SHI, J.; YOSHINO, O.; OSUGA, Y.; KOGA, K.; HIROTA, Y.; HIRATA, T.; YANO, T.; NISHII, O.; TAKETANI, Y. Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin β subunits, and anti-Mullerian hormone in human granulosa cells. **Fertil. Steril.**, v. 92, p. 1794-1798, 2009.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G. F The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocr. Rev.**, v. 25, p. 72-101, 2004.

SHIMASAKI, S.; ZACHOW, R. J.; LI, D.; KIM, H.; IEMURA, S.; UENO, N.; SAMPATH, K.; CHANG, R. J.; ERICKSON, G. F. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, p. 7282-7287, 1999.

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

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T.; ROELEN, B. A.; FIGUEIREDO, J. R. The Kit ligand/c-Kit receptor system in goat ovaries: gene expression and protein localization. **Zygote**, v. 14, p. 317-328, 2006.

SIROVER, M. A. Novas funções das proteínas glicolíticas,-3-fosfato desidrogenase gliceraldeído, em células de mamíferos. **J. Cell Biochem.**, v. 95:1, p. 45-52, 2005.

SONG, K.; KRAUSE, C.; SHI, S.; PATTERSON, M.; SUTO, R.; GRGUREVIC, L.; VUKICEVIC, S.; VAN DINTHER, M.; FALB, D.; TEN DIJKE P.; ALAOUI-ISMAILI, M. H. Identification of a Key Residue Mediating Bone Morphogenetic Protein (BMP)-6 Resistance to Noggin Inhibition Allows for Engineered BMPs with Superior Agonist Activity. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 16, p. 12169–12180, 2010.

SONG, S.; FINKEL, T. GAPDH and the search for alternative energy. **Nat. Cell Biol.**, v. 9, p. 869-870, 2007.

SOUZA, C. J.; CAMPBELL, B. K.; MCNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. **Reproduction**, v. 123, p. 363-369, 2002.

SPANAKIS, E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 3809-3819, 1993.

STEINAU, M.; RAJEEVAN, M. S.; UNGER, E. R. DNA and RNA References for qRT-PCR Assays in Exfoliated Cervical Cells. **J. Mol. Diag.**, v. 8, p. 113-118, 2006.

SU, Y. Q.; WU, X.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; DENEGRÉ, J. N.; MATZUK, M. M.; EPPIG, J. J. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte–cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte–granulosa cell regulatory loop. **Dev. Biol.**, v. 276, p. 64–73, 2004.

SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M. J.; AFFOURTIT, J. P.; PANGAS, S. A.; MATZUK, M. M.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. **Development**, v. 135, p. 111–121, 2008.

SUZUKI, N.; YOSHIDA, A.; NAKANO, Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. **Clin. Med. Res.**, v. 3, p. 176-185, 2005.

SUZUKI, T.; HIGGINS, P. J.; CRAWFORD, D. R. Control selection for RNA quantitation. **Biotechniques**, v. 29, p. 332-337, 2000.

TELFER, E. E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. **Theriogenology**, v. 45, p. 101-110, 1996.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B. *Housekeeping* genes as internal standards: use and limits. **J. Biotechnol.**, v. 75, p. 291–295, 1999.

THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**, v. 146, p. 941-949, 2005.

TREIER, M.; GLEIBERMAN, A. S.; O'CONNELL, S. M.; SZETO, D. P.; MCMAHON, J. A.; MCMAHON, A. P.; ROSENFELD, M. G. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. **Genes Dev.**, v. 12, p. 1691-1704, 1998.

UCHIYAMA, A.; BESSELSSEN, D. G. Detection of Reovirus type 3 by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Lab. Anim.**, v. 37, p. 352–359, 2003.

URSCHEL, M. R.; O'BRIEN, K. M. High mitochondrial densities in the hearts of Antarctic icefishes are maintained by an increase in mitochondrial size rather than mitochondrial biogenesis. **J. Exp. Biol.**, v. 211, p. 2638-2646, 2008.

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.

VAN TOL, H. T. A.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J. Enhancement of bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 75, p. 578–587, 2007.

VAN ZEVEVEREN, A. M.; VISSER, A.; HOORENS, P. R.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOUW, E.; GELDHOF, P. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Ostertagia ostertagi* by the coefficient of variation and geNorm approach. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 153, p. 224-227, 2007.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, p. 34.1–34.11, 2002.

VITT, U. A.; HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. W. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. **Mol. Endocrinol.**, v. 15, p. 681–694, 2001.

WANG, E. A.; ROSEN, V.; D’ALESSANDRO, J. S.; BAUDUY, M.; CORDES, P.; HARADA, T.; ISRAEL, D. I.; HEWICK, R. M.; KERNS, K. M.; LAPAN, P.; LUXENBERG, D. H.; MCQUID, D.; MOUTSATSOS, I. K.; NOVE, J.; WOZNEY, J. M. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, p. 2220–2224, 1990.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2. ed. W. H. Freeman and Company, New York, 1992. 626p.

WEST, F. D.; ROCHE-RIOS, M. I.; ABRAHAM, S.; RAO, R. R.; NATRAJAN, M. S.; BACANAMWO, M.; STICE, S. L. KIT ligand and bone morphogenetic protein signaling enhances human embryonic stem cell to germ-like cell differentiation. **Hum. Reprod.**, v. 25, n.1, p. 168-178, 2010.

WIESER, R.; WRANA, J. L.; MASSAGUÉ, J. GS domain mutations that constitutively activate T R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. **EMBO. J.**, v. 14, p. 2199–2208, 1995.

WILSON, T.; WU, X. Y.; JUENGEL, J. L.; ROSS, I. K.; LUMSDEN, J. M.; LORD, E. A. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 1225-1235, 2001.

WINER, J.; JUNG, C. K.; SHACKEL, I.; WILLIAMS, P. M. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. **Analyt. Biochem.**, v. 270, p. 41-49, 1999.

WITTWER, C. T.; HERRMANN, M. G.; MOSS, A. A.; RASMUSSEN, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, v. 22, p. 130–138, 1997.

WITTWER, C. T.; KUSUKAWA, N. Real-time PCR. In: PERSING, D.; TENOVER, F.; RELMAN, D.; WHITE, T.; TANG, Y.; VERSALOVIC, J.; UNGER, B. eds. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, DC: ASM Press, 2002.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time for mRNA quantification. **Biotechniques**, v. 39(1), p. 1-11, 2005.

WOZNEY, J. M. Bone morphogenetic proteins. **Prog. Growth Factor Res.**, v. 1, p. 267–280, 1989.

WRANA, J. L.; ATTISANO, L.; WIESER, R.; VENTURA, F.; MASSAGUÉ, J. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. **Nature**, v. 370, p. 341–347, 1994.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 233-240, 2007.

WU, Y. T.; LU, X. E.; WANG, T. T.; HE, R. H.; XU, J.; HUANG, H. F. Women with poor response to ovarian stimulation have increased follicular bone morphogenetic protein-15 levels. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 36(5), p. 439-42, 2007b.

WU, Y. T.; TANG, L.; CAI, J.; LU, X. E.; XU, J.; ZHU, X. M.; LUO, Q.; HUANG, H. F. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. **Hum. Reprod.**, v. 22, n. 6, p. 1526–1531, 2007.

WURMBACH, E.; YUEN, T.; SEALFON, S. C. Focused microarray analysis. **Methods**, v. 31, p. 306-316, 2003.

XIA, Y.; YU, P. B.; SIDIS, Y.; BEPPU, H.; BLOCH, K. D.; SCHNEYER, A. L.; LIN, H. Y. Repulsive guidance molecule RGMa alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 18129-18140, 2007.

XU, M.; WEST, E.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Identification of a stage specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. **Biol. Reprod.**, v. 75, p. 916-923, 2006.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S, DUNBAR BS, DUBE JL. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Mol. Endocrinol.**, v. 15, p. 854–866, 2001.

YING, Y.; LIU, X. M.; MARBLE, A.; LAWSON, K. A.; ZHAO, G. Q. Requirement of BMP8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. **Mol. Endocrinol.**, v. 14, p. 1053–1063, 2000.

YING, Y.; ZHAO, G. Q. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. **Dev. Biol.**, v. 232, p. 484–492, 2001.

YING, Y.; ZHAO, G. Q. Detection of multiple bone morphogenetic protein messenger ribonucleic acids and their signal transducer, Smad1, during mouse decidualization. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 1781–1786, 2000.

YOSHIMURA, Y.; WALLACH, E. E. Studies of the mechanism(s) of mammalian ovulation. **Fert. Steril.**, v. 47, p. 22-34, 1987.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H. E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **PNAS**, v. 103, p. 10678-10683, 2006.