

Efeito do fator de crescimento epidermal (EGF) na maturação *in vitro* de oócitos caninos

Effect of epidermal growth factor (EGF) on in vitro maturation of canine oocyte

Leda Maria Costa PEREIRA¹; Paulo Ricardo de Oliveira BERSANO^{2,3}; Maria Denise LOPES¹

¹ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu – SP, Brasil

² Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza – CE, Brasil

³ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, CEVAP-UNESP, Botucatu – SP, Brasil

Resumo

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a influência do EGF na maturação *in vitro* (MIV) de cadelas. Realizou-se o transporte dos ovários em solução de cloreto de sódio 0,9%, que foram seccionados em solução salina fosfato tamponado (PBS) e os complexos *cumulus* oócito (COCs) selecionados em meio de cultura de tecidos (TCM) 199 suplementado com HEPES. Foram coletados 405 oócitos grau 1 de cadelas em anestro e diestro. Os oócitos provenientes das duas fases do ciclo estral foram submetidos a dois tratamentos: meio com adição de 10 ng/mL do fator de crescimento epidermal (EGF) (T) e meio sem suplementação (C). Depois de 72 horas de maturação, os COCs foram desnudados, fixados e corados com HOESCHT 33342 para avaliação da maturação nuclear. Os oócitos obtidos dos ovários da fase de diestro do grupo T demonstraram maior porcentagem (18,8%) de oócitos no estágio de metáfase II (M-II), em relação ao grupo C (1,3%) ($p < 0,01$). Nos oócitos obtidos da fase de anestro houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, observando-se menor parcela (4,1%) de oócitos no estágio de vesícula germinativa (VG) no grupo T, quando comparado ao grupo C (16,1%). Comparando-se as diferentes fases reprodutivas, em meios suplementados com EGF, foi observada diferença ($p < 0,05$) apenas nos oócitos obtidos da fase de diestro em relação ao estágio de M-II. Dessa maneira, a suplementação no meio de maturação na concentração de 10 ng/mL, neste estudo, exerceu influência positiva apenas na MIV de oócitos caninos oriundos da fase de diestro, incrementando os índices de M-II nessa espécie.

Palavras-chave: Maturação *in vitro*. EGF. Anestro. Diestro. Cadela.

Abstract

This work aimed to evaluate the influence of EGF on canine oocyte *in vitro* maturation (IVM). We carried out the transport of the ovaries in sodium chloride 0.9% solution, which were cut into phosphate-buffered saline (PBS) and the cumulus oocyte complexes (COCs) selected in tissue culture medium (TCM), supplemented with 199 HEPES. A total of 405 grade 1 oocytes were collected from bitches in anestrus and diestrus. Oocytes from the two phases of estrous cycle were subjected to two treatments: medium with addition of 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF) (T) and medium without supplementation (C). After 72 h of maturation, COCs were denuded, fixed and stained with Hoechst 33342 to assess nuclear maturation. The oocytes obtained from the ovaries of the diestrus phase of the T group demonstrated higher percentage (18.8%) of oocytes at metaphase II stage (M-II) than C group (1.3%) ($p < 0.01$). The oocytes from anestrus phase demonstrated difference ($p < 0.05$) between the groups, observing smaller proportion (4.1%) of oocytes at the stage of germinal vesicle (GV) in group T compared to group C (16.1%). Comparing the different reproductive status in media supplemented with EGF difference ($p < 0.05$) was observed only in oocytes diestrus phase relative to the stage of M-II. Thus, supplementation on maturation medium at a concentration of 10 ng/mL of EGF in this study had positive influence only on IVM of canine oocytes obtained from diestrus phase, increasing the levels of M-II in this species.

Keywords: *In vitro* maturation. EGF. Anestrus. Diestrus. Bitch.

Introdução

A maturação *in vitro* (MIV) é um dos passos primordiais para a produção de embriões viáveis. Entretanto, oócitos caninos maturados *in vitro* apresentam comprometimento em seu desenvolvimento quando comparados com oócitos maturados *in vivo*. De acordo com Brevini-Gandolfi e Gandolfi (2001), uma das

Correspondência para:

Leda Maria Costa Pereira
Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Área Reprodução Animal – Laboratório de Pequenos Animais e Silvestres
Distrito de Rubião Junior, s/n – Caixa Postal 560
CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brasil
e-mail: ledamcp@hotmail.com

Recebido: 24/01/2014

Aprovado: 13/06/2014

principais causas do baixo desempenho de oócitos maturados *in vitro* é o fato de serem retirados de folículos ainda imaturos, e não terem adquirido competência, o que ocorre no final do desenvolvimento folicular, após o pico de LH. Assim, a compreensão adequada das necessidades metabólicas do oócito em sistemas de cultivo de MIV pressupõe a necessidade de novos estudos para que seja estabelecida uma condição ideal para que maior número possível de oócitos maturados *in vitro* adquira a competência de se desenvolver e se tornar apto para sustentar o desenvolvimento inicial do embrião (BARRETO, 2007).

Atualmente, existem diversos protocolos de MIV e fecundação *in vitro* (FIV). As pesquisas com a espécie canina utilizam meios de cultivo semelhantes aos utilizados nas demais espécies (VANNUCCHI, 2003). Entretanto, as características bioquímicas dos oócitos de cadelas são distintas das observadas nestas espécies. Desse modo, há a necessidade de adaptações nas condições de cultivo *in vitro*, para garantir a eficácia da MIV. Em cadelas, a taxa de MIV tem demonstrado sucesso limitado, variando de 0 a 58% para oócitos maturados até a anáfase I e metáfase II (M-II) (NICKSON et al., 1993).

Diversas substâncias presentes no fluido folicular e acrescidas ao meio de maturação como FSH, LH, estrógenos e fatores de crescimento como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) desempenham um papel sinérgico no desenvolvimento oocitário. Essas substâncias aumentam a sobrevivência dos oócitos em cultura, auxiliando a suportar a maturação e a consequente fecundação, pois, previnem alterações desfavoráveis na zona pelúcida e favorece a aderência das células do *cumulus* ao oócito (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998).

O EGF exerce um papel de suma importância na atividade ovariana de mamíferos, em promoção do crescimento do oócito e do número de células foliculares (RAJARAJAN et al., 2006). De acordo com Buccione, Schroeder e Eppig (1990), a principal função do EGF

é estimular a síntese de glutatona intracelular no oócito. A glutatona tem como efeitos principais proteger o DNA, agir na síntese de proteína e no transporte de aminoácidos, além de regular a maturação oocitária, promovendo a quebra da vesícula germinativa e a expansão das células do *cumulus*.

A adição de fatores de crescimento, como o EGF, visa simular as condições fisiológicas do ambiente *in vivo* da cadela. De acordo com Lonergan et al. (1996), a suplementação com EGF em diferentes concentrações (1-100 ng/mL), durante a MIV de oócitos bovinos, melhora a maturação oocitária, expansão das células do *cumulus*, taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário. Segundo Hsieh et al. (2007), os fatores de crescimento ligantes de EGF são mediadores parácrinos de sinalização do LH durante a ovulação. Em oócitos caninos, a suplementação com 20 ng/mL de EGF proporcionou melhores taxas de metáfase II (KIM et al., 2004). Song et al. (2010), utilizando a concentração de 10 ng/mL de EGF, também encontraram melhores taxas de maturação utilizando esta concentração do que a suplementação com 0 e 30 ng/mL. De acordo com esses autores, a adição de 10 ng/mL de EGF é a que permite melhores condições de progressão da maturação.

Efeitos positivos da adição de EGF no meio de maturação foram observados na MIV de ratos (LONERGAN et al., 1996), camundongos (DAS et al., 1992), bovinos (RIEGER et al., 1998) e na espécie canina (BOLAMBA et al., 2006; SONG et al., 2010). Entretanto, o conhecimento acerca da influência desse fator de crescimento no processo de maturação na cadela ainda é escasso. Em vista do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do EGF na maturação de oócitos caninos provenientes de cadelas em anestro e diestro.

Material e Métodos

Foram utilizadas cadelas de diversas raças, com idade variável entre 6 meses e 7 anos, submetidas à ovariectomia (OHE) eletiva no Serviço de

Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu. O estudo teve o aceite da Câmara de Ética da FMVZ – UNESP *campus* de Botucatu com protocolo número 176/2011.

Os ovários foram isolados assepticamente, imersos em solução salina 0,9% e transportados à temperatura de 4°C para o Laboratório de Reprodução Animal de Pequenos Animais e Silvestres, onde foram processados no prazo máximo de 4 horas após o procedimento cirúrgico. A identificação da fase do ciclo estral foi baseada na classificação proposta por Otoi et al. (2002) da fase de anestro (ovários com ausência de folículos ou corpo lúteo) e diestro (ovários com a presença de um ou mais corpos lúteos). Posteriormente, os ovários foram fatiados em solução aquecida 37°C de *phosphate buffer solution* (PBS) adicionada de 10% de soro fetal bovino (SFB). Após o processo de seleção, os complexos *cumulus-oócito* (COCs) foram lavados em meio *tissue culture medium* 199 (TCM-199) tamponado com 25 mM de HEPES, acrescido de solução de 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 0,2 mM de piruvato e 5 mM de bicarbonato de sódio.

Após a seleção dos COCs grau 1, estes foram divididos entre os grupos-controle (C) e tratamento (T). Os oócitos do grupo controle (C) foram submetidos à MIV em placas de cultivo de quatro poços, contendo 500 µL de meio de maturação TCM-199 suplementado com 25 mM de HEPES, solução de 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 26 mM de bicarbonato de sódio, 1,5 mM de piruvato de sódio, 2,9 mM lactato de sódio pentahidratado, 0,6 mM de cisteína, 0,03 UI/mL de hCG, 0,5 µg/mL de FSH e 20 µg/mL de E2. Os oócitos do grupo tratamento (T) foram mantidos em placas de quatro poços contendo 500 µL de meio de maturação com todos os componentes utilizados para o grupo controle (C), porém com a adição de 10 ng/mL do fator de crescimento epidermal (EGF). As placas dos dois grupos foram acondicionadas em estufa úmida a 38,5°C em atmos-

fera de 5% de CO₂ em ar por um período de 72 horas. Após esse período de cultivo, os COCs foram colocados em solução de hialuronidase 0,2%, por 5 minutos, para a liberação completa das células do *cumulus*, por meio de aspirações repetidas.

Os oócitos foram então transferidos para uma solução de PBS suplementado com paraformaldeído a 3,7%, sendo lavados novamente no PBS e corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342. Os oócitos foram colocados entre lâmina e lamínula, e avaliados pelo microscópio de luz e fluorescência Leica® DFC 310 FX para avaliação da maturação nuclear. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Fisher (PROC FREQ, STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2009) com nível de significância de 5%.

Resultados

Os oócitos foram classificados, de acordo com a morfologia do DNA, em cinco estágios: vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (M-I) metáfase II (M-II) e degenerados ou não passíveis de identificação. Foi isolado um total de 405 oócitos (226 oócitos obtidos de ovários na fase de anestro e 179 oócitos obtidos de ovários na fase de diestro), que foram classificados como grau I e utilizados para avaliação da maturação nuclear. Os oócitos selecionados foram divididos nos grupos C (sem adição de EGF) e T (com adição de EGF).

A avaliação da maturação nuclear dos oócitos obtidos da fase de diestro provenientes do grupo C (sem suplementação de EGF) revelou que oito (10,3%) se apresentaram em VG, dezessete (21,8%) em QVG, treze (16,7%) em MI, um (1,3%) em MII e trinta e nove (50%) eram degenerados ou não passíveis de identificação. Enquanto nos oócitos do grupo T, foram observados sete (6,9%) em VG, vinte e quatro (23,8%) em QVG, dezenove (18,8%) em MI, dezenove (18,8%) em MII e trinta e dois (31,7%) eram degenerados ou não passíveis de identificação. Apenas o estágio de MII apresentou diferença ($p < 0,05$) entre os grupos T e C na fase de diestro (Tabela 1).

A avaliação da maturação nuclear dos oócitos obtidos da fase de anestro, provenientes do grupo C (sem suplementação de EGF), revelou que catorze (16,9%) se apresentaram em VG, quinze (18,1%) em QVG, onze (13,2%) em MI, cinco (6,0%) em MII e 37 (44,6%) eram degenerados ou não passíveis de identificação. Enquanto nos oócitos do grupo T foram observados seis (4,1%) em VG, vinte e um (14,5%) em QVG, vinte e seis (17,9%) em MI, doze (8,3%) em MII e setenta e nove (54,5%) eram degenerados ou não passíveis de identificação. Apenas o estágio de VG

apresentou diferença ($p < 0,05$) entre os grupos T e C na fase de anestro (Tabela 2).

Comparando-se o efeito da suplementação do EGF no meio de maturação nas diferentes condições reprodutivas, observou-se que os oócitos obtidos da fase de diestro apresentaram maior porcentagem ($p < 0,05$) de oócitos no estágio de MII (18,8%) do que os oócitos obtidos da fase de anestro (8,3%) (Tabela 3).

Na avaliação dos meios sem suplementação do EGF, nas fases de anestro e diestro, não foi observada diferença ($p > 0,05$) nos diferentes estágios de maturação nuclear (Tabela 4).

Tabela 1 – Maturação *in vitro* de oócitos obtidos da fase de diestro em meio suplementado (T) e não suplementado (C) com EGF – Botucatu – 2013

Grupo	Oócitos avaliados (n/%)				
	VG	QVG	M-I	M-II	DEG
Controle (C)	08 (10,3) ^a	17 (21,8) ^a	13 (16,7) ^a	01 (1,3) ^a	39 (50,0) ^a
Tratamento (T)	07 (6,9) ^a	24 (23,8) ^a	19 (18,8) ^a	19 (18,8) ^b	32 (31,7) ^a

Letras diferentes dentro da mesma coluna evidenciam diferença significativa, $p < 0,05$

Tabela 2 – Maturação *in vitro* de oócitos obtidos da fase de anestro em meio suplementado (T) e não suplementado com EGF (C) – Botucatu – 2013

Grupo	Oócitos avaliados (n/%)				
	VG	QVG	M-I	M-II	DEG
Controle (C)	14 (16,9) ^a	15 (18,1) ^a	11 (13,2) ^a	05 (6,0) ^a	37 (44,6) ^a
Tratamento (T)	06 (4,1) ^b	21 (14,5) ^a	26 (17,9) ^a	12 (8,3) ^a	79 (54,5) ^a

Letras diferentes dentro da mesma coluna evidenciam diferença significativa, $p < 0,05$

Tabela 3 – Efeito da suplementação com EGF na maturação *in vitro* de oócitos obtidos das fases de anestro e diestro – Botucatu – 2013

Grupo	Oócitos avaliados (n/%)				
	VG	QVG	M-I	M-II	DEG
Anestro	06 (4,1) ^a	21 (14,5) ^a	26 (17,9) ^a	12 (8,3) ^a	79 (54,5) ^a
Diestro	07 (6,9) ^a	24 (23,8) ^a	19 (18,8) ^a	19 (18,8) ^b	32 (31,7) ^a

Letras diferentes dentro da mesma coluna evidenciam diferença significativa, $p < 0,05$

Tabela 4 – Efeito do meio sem suplementação na maturação *in vitro* de oócitos obtidos das fases de anestro e diestro – Botucatu – 2013

Grupo	Oócitos avaliados (n/%)				
	VG	QVG	M-I	M-II	DEG
Anestro	14 (16,9) ^a	15 (18,1) ^a	11 (13,2) ^a	05 (6,0) ^a	37 (44,6) ^a
Diestro	08 (10,3) ^a	17 (21,8) ^a	13 (16,7) ^a	01 (1,3) ^a	39 (50,0) ^a

Letras diferentes dentro da mesma coluna evidenciam diferença significativa, $p < 0,05$

Discussão

A maioria dos autores que trabalha com biotecnologias reprodutivas na espécie canina, especialmente a maturação *in vitro* (MIV) e a fertilização *in vitro* (FIV), concorda de forma unânime com a grande dificuldade para a obtenção de resultados satisfatórios. De acordo com Telfer (1998), o sistema de cultivo *in vitro* ideal para o desenvolvimento oocitário seria aquele em que os oócitos isolados atingissem o crescimento e a competência para a maturação em um meio definido sem a unidade folicular. Entretanto, apesar das inúmeras tentativas de se estabelecer um meio apropriado para MIV de oócitos caninos, os conhecimentos acerca dos eventos endócrinos que ocorrem *in vivo*, na cadela, são limitados. Dessa maneira, as suplementações realizadas nos meios de maturação não são eficientes em simular de forma fidedigna o ambiente *in vivo*, possibilitando a aquisição da competência meiótica de oócitos caninos. Nesse contexto, os fatores de crescimento vêm sendo muito utilizados no meio de cultivo, com o objetivo de melhorar as taxas de maturação oocitária nessa espécie.

Entre os fatores de crescimento mais utilizados na MIV de oócitos caninos pode-se destacar o EGF. Este fator de crescimento é um polipeptídeo encontrado por todo o corpo, inclusive em folículos antrais em crescimento no ovário e estão envolvidos na síntese de DNA e proliferação das células da granulosa (KIM et al., 2004). Além disso, desempenha papel essencial na regulação da maturação e expansão das células do *cumulus* (FARIN et al., 2007).

Bolamba et al. (2006), avaliando meio de maturação suplementado com FSH, LH, estradiol e EGF, observaram que este fator de crescimento utilizado isoladamente não é suficiente para promover a maturação dos oócitos e nem promover a expansão das células do *cumulus*. Entretanto, quando acrescido em meio com tratamento hormonal tem a capacidade de realizar essas funções. Russ et al. (1998) também demonstraram o efeito positivo do EGF associado a gonadotrofinas no meio de maturação para promover a expansão

das células do *cumulus*. Reizel, Elbaz e Dekel (2010), referem que esse fator além de atuar sozinho, parece interagir de forma positiva com as gonadotrofinas, esteroides e fatores de crescimento durante a fase final de desenvolvimento folicular. No presente estudo, a adição de EGF em meio suplementado com FSH, hCG e estradiol demonstrou melhores taxas de metáfase II nos oócitos obtidos de cadelas em diestro do que o meio sem a suplementação do fator de crescimento. Além disso, nos oócitos obtidos de cadelas em anestro, presenciou-se menor porcentagem ($p < 0,05$) de oócitos nos estágios de vesícula germinativa, quando maturados em meio com EGF. Dessa maneira, pode-se observar que a adição do EGF em meio com tratamento hormonal parece promover melhor capacitação oocitária, melhorando as taxas de maturação nessa espécie.

Sakaguchi et al. (2000) observaram aumento da retomada da meiose em COCs bovinos cultivados na presença de EGF, o que não foi presenciado em oócitos desnudos, sugerindo que o EGF participe do controle da maturação nuclear de forma indireta, via células do *cumulus*. Desse modo, supõe-se que a expressão do EGFR nas células do *cumulus* seja requerida para que o EGF desempenhe suas funções (CONTI et al., 2006). Os COCs estão conectados funcional e fisicamente por uma complexa rede de comunicação bidirecional mediada pelas junções *gap*. Essas junções são essenciais para a troca de nutrientes e de moléculas mensageiras como o AMP cíclico, desempenhando papel fundamental na maturação citoplasmática e nuclear do oócito. Luvoni et al. (2001) constataram ausência de junções permeáveis em oócitos obtidos da fase de anestro. Esses autores mostraram que COCs obtidos de cadelas nessa fase apresentam as junções *gap* fechadas. Dessa maneira, Conti et al. (2006); Sakaguchi et al. (2000) demonstram que a função do EGF na MIV parece sofrer influência das células do *cumulus*. Essa falta de comunicação existente nos COCs obtidos da fase de anestro poderia explicar, neste estudo, as melhores taxas de metáfase

II ($p < 0,05$) observadas apenas nos oócitos obtidos da fase de diestro, em meios suplementados com EGF.

Kim et al. (2004), verificaram que a adição de 20 $\eta\text{g}/\text{mL}$ de EGF ao meio TCM 199 proporciona aumento significativo sobre a taxa de competência meiótica. Esses autores, demonstraram que o EGF melhorou os índices de maturação quando foram utilizados oócitos de cadelas em estro e por um período de 72 horas. No presente estudo, foram utilizados oócitos obtidos de cadelas em anestro e diestro, maturados por um período de 72 horas, em meio suplementado com 10 $\eta\text{g}/\text{mL}$ de EGF. Comparando-se as diferentes condições reprodutivas, observou-se neste estudo diferença ($p < 0,05$) apenas no estágio de metáfase II, nos oócitos obtidos da fase de diestro, em meio suplementado com EGF.

Em felinos, foi observado que a adição no meio de maturação com EGF proporcionou o desenvolvimento do oócito até a M-II e que este fator de crescimento é requerido pelo FSH para a progressão meiótica do oócito (FARIN et al., 2007). Nesta pesquisa, pode-se constatar maiores taxas de M-II nos oócitos maturados em meio suplementado com EGF, somente nos oócitos obtidos da fase de diestro ($p < 0,01$).

A concentração de EGF no fluido folicular varia de acordo com a espécie. Dessa maneira, tenta-se adicionar concentrações variadas no meio de maturação visando simular de forma mais fidedigna possível o ambiente in vivo. Em bovinos, a adição no meio de 30 $\eta\text{g}/\text{mL}$ de EGF proporcionou um aumento na taxa de M-II, sendo esta concentração considerada mais benéfica que a concentração de 10 $\eta\text{g}/\text{mL}$ e 50 $\eta\text{g}/\text{mL}$ (PARK; IGA; NIWA, 1997). Em uma pesquisa realizada por Oyamada, Iwayama e Fukui (2004), em bovinos, utilizando as concentrações de 0,1; 10 e 50 $\eta\text{g}/\text{mL}$, não foi observada diferença nos índices de M-II nas variadas concentrações. Este estudo utilizou a concentração de 10 $\eta\text{g}/\text{mL}$ e obteve melhores resul-

tados em relação às taxas de M-II nos oócitos obtidos da fase de diestro. De modo similar a esta pesquisa, Song et al. (2010), utilizando a concentração de 10 $\eta\text{g}/\text{mL}$ de EGF, também encontraram melhores taxas de maturação utilizando esta concentração do que a suplementação com 0 e 30 $\eta\text{g}/\text{mL}$. A concentração de 20 $\eta\text{g}/\text{mL}$ também já se apresentou benéfica na espécie canina (KIM et al., 2004). Não há como determinar se o efeito do EGF na MIV é dose-dependente, já que não há dados dos níveis de EGF no fluido folicular de ovários caninos (SONG et al., 2010). Além disso, outros fatores podem influenciar nas funções do EGF como a presença de gonadotrofinas no meio de maturação, a fase do ciclo estral da doadora ou a qualidade oocitária, incrementando as taxas de retomada da meiose e progressão da maturação.

O EGF exerce papel preponderante no controle da atividade ovariana em mamíferos. Em caprinos Rodríguez-Dorta et al. (2007), demonstraram que o EGF é expresso em todos os estágios de desenvolvimento folicular, no corpo lúteo e na superfície ovariana. Assim, a adição no meio de maturação deste fator de crescimento é uma alternativa de suplementação que permite a simulação do ambiente fisiológico da cadela, possibilitando o desenvolvimento da competência oocitária nessa espécie.

Conclusão

A suplementação no meio de maturação na concentração de 10 $\eta\text{g}/\text{mL}$ exerceu influência positiva na MIV de oócitos caninos oriundos da fase de diestro, incrementando os índices de M-II nessa espécie.

Agradecimentos

Agradecimento à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (FAPESP 2011/13197-1).

Referências

- BARRETO, L. S. S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino in vitro**. 2007. 88 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- BOLAMBA, D.; RUSS, K. D.; HARPE, S. A.; SANDLER, J.; DURRANT, B. S. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1037-1047, 2006.
- BREVINI-GANDOLFI, T. A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001. Disponível em: <[http://www.theriojournal.com/article/S0093691X\(01\)00481-2/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093691X(01)00481-2/abstract)>. Acesso em: 14 dez. 2013. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00481-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00481-2).
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatics cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 4, p. 543-547, 1990. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/43/4/543>>. Acesso em: 13 jan. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.43.4.543>.
- CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J. Y.; SU, Y. Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 715-723, 2006. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2005-0185>>. Acesso em: 15 jan. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/me.2005-0185>.
- DAS, K.; PHIPPS, W. R.; HENSLEIGH, H. C.; TAGATZ, G. E. Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 57, n. 4, p. 895-901, 1992.
- FARIN, C. E.; RODRIGUEZ, K. F.; ALEXANDER, J. E.; HOCKNEY, J. E.; HERRICK, J. R.; KENNEDY-STOSKOPE, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 97-112, 2007. Disponível em: <[http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(06\)00480-5/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(06)00480-5/abstract)>. Acesso em: 16 dez. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.007>.
- HEWITT, D. A.; WATSON, P. F.; ENGLAND, G. C. W. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 6, p. 1083-1101, 1998. Disponível em: <[http://www.theriojournal.com/article/S0093691X\(98\)00058-2/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093691X(98)00058-2/abstract)>. Acesso em: 26 jan. 2013. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00058-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00058-2).
- HSIEH, M.; LEE, D.; PANIGONE, S.; HORNER, K.; CHEN, R.; THEOLOGIS, A.; LEE, D. C.; THREADGILL, D. W.; CONTI, M. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. **Molecular Cellular Biology**, v. 27, n. 5, p. 1914-1924, 2007. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/content/27/5/1914>>. Acesso em: 16 jan. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01919-06>.
- KIM, M. K.; FIBRIANTO, Y. H.; OH, H. J.; JANG, G.; KIM, H. J.; LEE, K. S.; KANG, S. K.; LEE, B. C.; HWANG, W. S. Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 3, p. 253-258, 2004.
- LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; LANGENDONCKT, A. van; DONNAY, L.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 6, p. 1420-1429, 1996.
- LUVONI, G. C.; LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; GANDOLFI, F. Influence of different stages of the oestrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 141-146, 2001.
- NICKSON, D. A.; BOYD, J. S.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J. M.; HARVEY, M. J.; RENTON, J. P. Molecular biology methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, n. 12, p. 231-240, 1993. Supplement.
- OTOI, T.; WILLINGHAM, L.; SHIN, T.; KRAEMER, D. C.; WESTHUSIN, M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. **Reproduction**, v. 124, n. 6, p. 775-781, 2002. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/124/6/775>>. Acesso em: 14 dez. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1240775>.
- OYAMADA, T.; IWAYAMA, H.; FUKUI, Y. Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote**, v. 12, n. 2, p. 143-150, 2004. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=240889&fileId=S0967199404002710>>. Acesso em: 13 jan. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199404002710>.
- PARK, K. W.; IGA, K.; NIWA, K. Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically-defined medium. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1127-1135, 1997. Disponível em: <[http://www.theriojournal.com/article/S0093691X\(97\)00345-2/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093691X(97)00345-2/abstract)>. Acesso em: 16 jan. 2013. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093691X\(97\)00345-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093691X(97)00345-2).
- RAJARAJAN, K.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; TAMILMANI, G.; ARUNAKUMARI, G.; SREENU, M.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; RAO, V. H. Effect of various growth factors on the *in vitro* development of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 204-212, 2006. Disponível em: <[http://www.smallruminantresearch.com/article/S09214488\(05\)00075-1/abstract](http://www.smallruminantresearch.com/article/S09214488(05)00075-1/abstract)>. Acesso em: 17 dez. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.013>.
- REIZEL, Y.; ELBAZ, J.; DEKEL, N. Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 2, p. 402-411, 2010. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2009-0267>>. Acesso em: 14 dez. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/me.2009-0267>.
- RIEGER, D.; LUCIANO, A. M.; MODINA, S.; POCAR, P.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p. 123-130, 1998. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/112/1/123>>. Acesso em: 24 nov. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1120123>.
- RODRIGUEZ-DORTA, N.; COGNIÉ, Y.; GONZÁLEZ, F.; POULIN, N.; GUIGNOT, F.; TOUZÉ, J. L.; BARIL, G.; CABRERA, F.; ALAMO, D.; BATISTA, M.; GRACIA, A.; MERMILLOD, P. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 6, p. 908-913, 2007.
- RUSS, K. D.; BOLAMBA, D.; HARPER, S. A.; SANDLER, J. L.; DURRANT, B. S. Effects of epidermal growth factor and hormones on cumulus expansion and nuclear maturation of cultured dog oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 1, p. 147, 1998. Supplement 2.
- SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; NAGAI, T.; FIRST, N. L. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes *in vitro* and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. **Theriogenology**, v. 54, n. 8, p. 1327-1342, 2000.

SAS Institute. 2009. **SAS/STAT user's guide**. Version 9.2. Cary: SAS Institute Inc., 2009.

SONG, H. J.; KANG, E. J.; MAENG, G. H.; OCK, S. A.; LEE, S. L.; YOO, J. G.; JEON, B.; RHO, G. J. Influence of epidermal growth factor supplementation during *in vitro* maturation on nuclear status and gene expression of canine oocytes. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 439, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528810003097>>. Acesso em: 24 nov. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.003>.

TELFER, E. E. *In vitro* models for oocyte development. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 451-460, 1998. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/content/27/5/1914>>. Acesso em: 16 jan. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01919-06>.

VANNUCCHI, C. I. **Estudo da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de cães em meios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina**. 2003. 77 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.