

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Imunolocalização do fator de crescimento semelhante à
insulina (IGF-I) e do fator de crescimento epidermal (EGF) em
ovários caninos e seus efeitos sobre a maturação *in vitro* de
oócitos: avaliação nuclear**

**Diogo José Cardilli
Médico Veterinário**

**JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL
Fevereiro de 2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Imunolocalização do fator de crescimento semelhante
à insulina (IGF-I) e do fator de crescimento epidermal (EGF)
em ovários caninos e seus efeitos sobre a maturação *in vitro*
de oócitos: avaliação nuclear**

Diogo José Cardilli

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal)

JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL

Fevereiro de 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DIOGO JOSÉ CARDILLI – nascido em 20 de abril de 1981, em Itápolis, São Paulo. É Médico Veterinário formado pela Faculdade de Odontologia – UNESP, Campus de Araçatuba, em dezembro de 2003. Em 1º de fevereiro de 2004 ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal, o qual concluiu em 31 de janeiro de 2006, sob orientação do Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo. Em 1º de março de 2006, iniciou junto ao programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, curso de Mestrado da FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, o qual concluiu em fevereiro de 2008. Atualmente é doutorando do programa de Pós-graduação em Medicina veterinária, área de concentração: Reprodução animal, desta instituição, com o mesmo orientador. Durante o ano de 2009 realizou programa de doutorado sanduíche (PDEE-CAPES) junto ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidad Complutense de Madrid, Madrid-Espanha, sob orientação do Prof. Dr. José Félix Pérez Gutiérrez. Durante segundo semestre de 2009 realizou estágio no INIA-Madri-Espanha sob orientação do pesquisador Dr. Dimitrios Rizos.

Dedico a meu pai, meu grande amigo.

Tenho certeza que está muito feliz, e que está me protegendo aí de cima. Um dia nos encontraremos de novo...TE AMO!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por minha vida, minha família, amigos e por ter me colocado neste caminho.

A meus pais, Domingos e Marilza, meus exemplos de vida, que sempre me incentivaram e fizeram o impossível para que eu pudesse estudar.

A meu irmão Douglas, que por muitas vezes suportou sozinho muitos momentos difíceis que passamos na vida, principalmente no falecimento de nosso pai, enquanto eu estava em Madri.

A minha namorada Carolina, grande amor, amiga e companheira nos bons e maus momentos da vida.

Ao Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, pela orientação, amizade, confiança e por ter me ensinado muito durante estes oito anos (residência, mestrado e doutorado).

Ao Prof. Dr. José Félix Pérez-Gutiérrez também pela orientação, amizade e confiança, durante o ano de 2009 em Madri – Espanha.

A amiga Kellen pela ajuda na elaboração e execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Ademir de Oliveira pela valiosa colaboração nas análises estatísticas.

A FAPESP pelo apoio financeiro em forma de bolsa de doutorado, processo número 08/51896-6.

A CAPES pela bolsa de doutorado no exterior

Ao CNPQ pelo auxílio pesquisa.

A UNESP – Jaboticabal por ter me acolhido nestes últimos oito anos.

À UNESP – Araçatuba e a todos os meus ex-professores por minha formação como Médico Veterinário.

A Universidad Complutense de Madrid pela oportunidade e por ter me acolhido tão bem durante o ano de 2009.

Aos amigos do setor de obstetrícia da FCAV-Unesp e aos membros do projeto de esterilização de cães e gatos, sob coordenação do Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui, pela grande ajuda durante as cirurgias.

Aos pesquisadores do INIA-Madri-Espanha, Alfonso Gutiérrez Adam e Dimitrios Rizos pela orientação no estágio, e também a todos os amigos que ali me ajudaram muito: Célia, Maria, Carmen, Paula e Robinson

Aos amigos do “Antro HV” pelos momentos de alegria durante estes últimos dois anos.

Aos amigos espanhóis do futebol e aos amigos portugueses, mexicanos, salvadorenhos, colombianos, argentinos, venezuelanos e guatemaltecos que fizeram parte de minha vida durante o ano que estive Madri.

Aos animais que fizeram parte deste estudo...

Muito obrigado a todos!!!!!!!!!!!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE QUADROS.....	xix
RESUMO.....	xx
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Meios de transporte de ovários e Obtenção dos oócitos.....	2
2.2. Seleção dos oócitos.....	4
2.3. Meios de maturação.....	4
2.4. Tempo de cultivo	8
2.5. Formas de avaliação.....	8
2.6. Imuno-histoquímica.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Colheita dos ovários.....	12
4.2. Colheita dos oócitos.....	12
4.3. Maturação nuclear <i>in vitro</i> de oócitos caninos.....	14
4.4. Avaliação da maturação nuclear.....	15
4.5 Imuno-histoquímica.....	17
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5.1. Maturação <i>in vitro</i>	20
5.2. Imuno-histoquímica.....	20
6. RESULTADOS	21
6.1 MIV.....	21
6.2 IMUNO-HISTOQUIMICA.....	31

7. DISCUSSÃO.....	65
8. CONCLUSÕES.....	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	“3-amino-9-ethylcarbazole”
BSA	Albumina sérica bovina
CL	Células luteínicas
CF	Células foliculares
CCG	Cordões de células da granulosa
CO₂	Dióxido de Carbono
COCs	Complexo oócito- <i>cumulus</i>
COM	Controle
d	Coloração Dapi
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DEG	Degenerados
EGF	“Epidermal growth factor”
EGF-R	Receptor para o EGF
fol	Folículos
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPjs	Junções do tipo GAP
h	Coloração Hoestch
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HOESTCH	Bisbenzimidida
IGF-1	“Insuline growth factor”
IGF-1R	Receptor para o IGF-1
IHQ	Imuno-histoquímica
LH	Hormônio luteinizante
MI e MII	Metáfase I e II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
M0	Momento zero de avaliação
mL	Mililitros
ng	Nanograma

O₂	Oxigênio
QVG	Quebra de Vesícula Germinativa
SFB	Soro fetal bovino
TGF-ALFA	“Transforming growth factor alfa”
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBT	Solução salina tamponada com fosfato e triton x100
PCNA	Antígeno de proliferação nuclear
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
TCM 199	“Tissue Culture Medium “199
VG	Vesícula Germinativa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de frequências racial e individual dos complexos <i>cumulus</i> oócitos caninos (COCs). Jaboticabal-SP, 2012.	22
Tabela 2	Distribuição de frequências racial dos complexos <i>cumulus</i> oócitos caninos (COCs). Jaboticabal-SP, 2012.	22
Tabela 3	Distribuição de frequências das doadoras e dos complexos <i>cumulus</i> oócitos caninos (COCs) por faixa etária. Jaboticabal-SP, 2012	22
Tabela 4	Distribuição de frequências das doadoras e dos complexos <i>cumulus</i> oócitos (COCs) caninos nas diferentes fases do ciclo estral. Jaboticabal-SP, 2012.	23
Tabela 5	Frequência absoluta e relativa (%) de COCs recuperados de 34 fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Jaboticabal-SP, 2012.	23
Tabela 6	Frequência absoluta e relativa (%) de oócitos caninos perdidos durante o procedimento de coloração nuclear por grupo. Jaboticabal-SP, 2012.	24
Tabela 7	Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados no M0 e após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados em cada meio de maturação, sendo CON (controle), IGF, EGF e M0. Jaboticabal-SP, 2012.	24
Tabela 8	Frequência absoluta dos COCs grau I, avaliados no M0 e após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas no anestro, diestro e estro, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados em cada meio de maturação, sendo CON (controle), IGF, EGF e M0. Jaboticabal-SP, 2012.	25
Tabela 9	Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados no M0 e após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados em cada meio de maturação, sendo CON (controle), IGF, EGF e M0. Jaboticabal-SP, 2012.	28

Tabela 10	Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados no M0 e após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados em cada meio de maturação, sendo CON (controle), IGF, EGF e M0. Jaboticabal-SP, 2012.	28
Tabela 11	Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados (DEG) do grupo controle (CON). Jaboticabal-SP, 2012.	29
Tabela 12	Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados do grupo IGF. Jaboticabal-SP, 2012	30
Tabela 13	Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados do grupo EGF. Jaboticabal-SP, 2012.	30
Tabela 14	Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados no M0, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados do grupo M0. Jaboticabal-SP, 2012.	31
Tabela 15	Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-EGF, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.	32
Tabela 16	Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-EGF-R, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.	39
Tabela 17	Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo	44

anti-TGF-ALFA, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.

Tabela 18	Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-IGF-1, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012	50
Tabela 19	Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-IGF-1R, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotografia do fatiamento dos ovários de cadelas após a coleta e placas de cultivo 35 x 10mm (setas) contendo solução para lavagem e seleção dos oócitos. Jaboticabal-SP, 2012 **13**
- Figura 2** Fotomicrografia de COCs Grau 1. Note ooplasma uniformemente escuro, com zona pelúcida intacta, circundado por uma ou mais camadas de células do *cumulus* e com diâmetro superior a 100 µm. Microscópio estereoscópio, aumento de 4x. Jaboticabal-SP, 2012. **14**
- Figura 3** Fotografia exemplificando a placa de cultivo tipo nunc com meio de maturação, onde os COCs Grau I ficaram incubados por 96 horas em estufa a 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂. O exemplo acima se refere a uma cadela no estro, da qual foram obtidos 40 oócitos grau 1, sendo distribuídos 10 oócitos para cada grupo (M0, COM, EGF e IGF-1), vale ressaltar que o grupo M0 não sofre maturação, portanto não encontra-se representado na placa. Jaboticabal-SP, 2012. **15**
- Figura 4** Fotomicrografia dos oócitos após remoção das células do *cumulus*. Jaboticabal-SP, 2012. **16**
- Figura 5** Esquema representativo de todo o processo de MIV. (1) *slicing*, (2) oócitos grau 1, (3) placa nunc com os meios de maturação, (4) oócitos desnudos, (5) avaliação nuclear da MIV. Jaboticabal-SP, 2012. **17**
- Figura 6** Fotomicrografia de oócitos caninos corados pela técnica de fluorescência (Hoechst 33342) onde nas setas vermelhas são evidenciados: Vesícula germinativa (A), Quebra de vesícula germinativa (B) e Metáfase I (C). Jaboticabal-SP, 2012 **26**
- Figura 7** Fotomicrografia de oócitos caninos corados pela técnica de fluorescência (DAPI) onde nas setas vermelhas são evidenciados: Vesícula germinativa (A), Quebra de vesícula germinativa (B), Metáfase I (C) e Degenerado (D). Jaboticabal-SP, 2012. **27**
- Figura 8** Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-EGF. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **33**
- Figura 9** Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-EGF. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **34**

- Figura 10** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células foliculares de folículos secundários (A,B) e citoplasma de oócito de folículo secundário (A,C,D). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FS (Folículo secundário); CF (Células foliculares); OO (Oócito). Jaboticabal-SP, 2012. **35**
- Figura 11** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células foliculares de folículos terciários (A,B) e nos túbulos corticais (C,D). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FT (Folículo terciário); CF (Células foliculares); OO (Oócito); CL (Células luteínicas); CCG (Cordões de células da granulosa); TC (Túbulos corticais). Jaboticabal-SP, 2012. **36**
- Figura 12** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células luteínicas (A,B) e na parede vascular (C,D). Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. CL (Células luteínicas); PV (Parede vascular) Jaboticabal-SP, 2012. **37**
- Figura 13** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas (A,B) e glândula salivar de rato (C,D), demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento epidermal (EGF) nos cordões de células da granulosa (A,B) de ovários de cadelas e na glândula salivar de rato (C,D), utilizada como controle positivo. Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. CCG (Cordões de células da granulosa). Jaboticabal-SP, 2012. **38**
- Figura 14** Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-EGF-R. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **40**

- Figura 15** Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-EGF-R. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **41**
- Figura 16** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) nas células foliculares de folículos primários (A,B) e secundários (C,D). Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FP (Folículo primário); FS (Folículo secundário); CF (Células foliculares). Jaboticabal-SP, 2012. **42**
- Figura 17** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário de cadela (A,B) e útero de cadela (C,D), demonstrando a imunolocalização do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) nos túbulos corticais (B) e epitélio superficial (A,B) de ovários de cadelas, e no útero e cadelas (C,D), utilizado como controle positivo. Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FS (Folículo secundário); CCG (Cordões de células da granulosa); ES (Epitélio superficial); TC (Túbulos corticais); GE (Glândulas endometriais). Jaboticabal-SP, 2012. **43**
- Figura 18** Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-TGF-ALFA. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **45**
- Figura 19** Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-TGF-ALFA. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **46**
- Figura 20** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do *Transforming growth factor alfa* (TGF-ALFA) nas células foliculares de folículos secundários (A,B), citoplasmas de oócitos em folículos primordiais (A), túbulos corticais (A), células luteínicas e epitélio superficial (A), cordões de células da granulosa e parede vascular (C,D). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículo primordial); FP (Folículo primário); FS (Folículo secundário); CCG (Cordões de células da **47**

granulosa); PV (Parede vascular). Jaboticabal-SP, 2012.

- Figura 21** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do *Transforming growth factor alfa* (TGF-ALFA) nos oócitos de folículos primordiais e túbulos corticais (A,B), citoplasmas de oócitos e células foliculares de folículos terciários (C,D). Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículo primordial); FS (Folículo secundário); FT (Folículo terciário); CF (Células foliculares); TE (Teca); TC (Túbulos corticais). Jaboticabal-SP, 2012. **48**
- Figura 22** Fotomicrografia de cortes histológicos de útero de cadela, demonstrando a imunolocalização do *Transforming growth factor alfa* (TGF-ALFA), utilizado como controle positivo. Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada. A imagem foi obtida na objetiva de 10x. A imagem B foi obtida na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. GE (Glândulas endometriais). Jaboticabal-SP, 2012. **49**
- Figura 23** Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-IGF-1. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **51**
- Figura 24** Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-IGF-1. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **52**
- Figura 25** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) nas células foliculares de folículos primários (A,B) e secundários (A,B,C,D), em oócitos de folículos primordiais (A), primários (A) e secundários (A,B,C) e nos túbulos corticais (C). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículo primordial); FP (Folículo primário); FS (Folículo secundário); CF (Células foliculares); TC (Túbulos corticais). Jaboticabal-SP, 2012. **53**
- Figura 26** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, **54**

demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) nas células foliculares de folículos primários, secundários (A,B) e terciários (C,D) e nas células da teca (C,D). Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículo primordial); FP (Folículo primário); FS (Folículo secundário); CF (Células foliculares); TE (Células da teca). Jaboticabal-SP, 2012

- Figura 27** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário de cadela (A,B) e útero de cadela (C,D), demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) nas células foliculares de folículos secundários (A), túbulos corticais (A,B), epitélio superficial (A,B) e parede vascular (A) de ovários de cadelas, e também no útero de cadelas com hiperplasia endometrial cística (C,D), utilizado como controle positivo. Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FS (Folículos secundários); TC (Túbulos corticais); ES (Epitélio superficial); GE (Glândulas endometriais). Jaboticabal-SP, 2012. **55**
- Figura 28** Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-IGF-1R. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2011. **57**
- Figura 29** Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-IGF-1R. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **58**
- Figura 30** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) nas células foliculares de folículos primários (A,B), oócitos de folículos primordiais (A,B), túbulos corticais (C), epitélio superficial (C), oócitos de folículos primordiais (C) e células foliculares e oócitos de folículos secundários (C,D). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículos primordiais); FP (Folículos primordiais); FS (Folículos secundários); OO (Oócitos); CF (Células foliculares). Jaboticabal-SP, 2012. **59**
- Figura 31** Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário de cadela (A,B) e testículo **60**

de rato (C,D), demonstrando a Imunolocalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) nas células foliculares de folículos terciários (A) e oócitos de folículos terciários (A,B) de ovário de cadelas e nos túbulos seminíferos de ratos (C,D), utilizados como controle positivo. Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FT (Folículos terciários); CF (Células foliculares); OO (Oócito); TS (Túbulos seminíferos). Jaboticabal-SP, 2012.

- Figura 32** Comparação da intensidade de coloração (azul) e porcentagem de células coradas (roxo) entre os anticorpos para cada estrutura avaliada. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **61**
- Figura 33** Comparação da intensidade de coloração (azul) e porcentagem de células coradas (roxo) entre os anticorpos para cada estrutura avaliada. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **62**
- Figura 34** Comparação da intensidade de coloração (azul) e porcentagem de células coradas (roxo) entre os anticorpos para cada estrutura avaliada. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **63**
- Figura 35** Comparação da intensidade de coloração (azul) e porcentagem de células coradas (roxo) entre os anticorpos para cada estrutura avaliada. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012. **64**

LISTA DE QUADROS

Quadro1	Anticorpos primários e concentrações utilizadas na imuno-histoquímica. Jaboticabal-SP, 2012.	18
Quadro2	Anticorpos secundários utilizados para cada anticorpo primário e as respectivas diluições. Jaboticabal-SP, 2012.	19
Quadro3	Escore dados para cada intensidade coloração e porcentagem de células coradas. Jaboticabal-SP, 2012	21

Imunolocalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e do fator de crescimento epidermal (EGF) em ovários caninos (*Canis familiaris*) e seus efeitos sobre a maturação *in vitro* de oócitos (MIV): avaliação nuclear

RESUMO - O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito dos fatores de crescimento IGF-I e EGF sobre a maturação nuclear de oócitos caninos e também imunolocalizar estes fatores em amostras de ovários de cadelas. Foram selecionados 787 complexos cumulus-oócitos (COCs), provenientes de ovários de 34 cadelas, em diferentes fases do ciclo estral, submetidas a ovário-histerectomias eletivas. Os COCs foram divididos em três grupos para diferentes tratamentos, A (TCM 199, n=199), B (TCM 199 + 100ng/mL de EGF, n=208) e C (TCM 199 + 100 ng/mL IGF-1, n=204). Após 96 horas de incubação a 38 °C em atmosfera de 5% de CO₂, 50% dos oócitos, desprovidos das células do cumulus, de cada grupo foram corados com Bisbenzimidaz H333342 (Hoechst) e 50% com 4',6-Diamidino-2-fenilindol (Dapi). A adição de EGF ou de IGF-1 ao meio TCM 199 não foi benéfica à maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de cadelas, e a coloração Hoechst foi mais eficaz para a avaliação dos estágios de maturação nuclear de oócitos de cadelas. Os tratamentos reprodutivos das 34 cadelas foram coletados, fixados, processados e incluídos em parafina. Os fragmentos de ovários foram cortados, montados em lâmina, desparafinizados e reidratados. A técnica de Imuno-histoquímica foi realizada utilizando os seguintes anticorpos: Anti-EGF-pc (Ab-3, Calbiochem), Anti-IGF-1-pc (Ab-2, Calbiochem). As amostras foram incubadas *overnight*. O anticorpo primário foi detectado utilizando IgG secundária biotinizada de cabra anti-coelho ou de coelho anti-cabra, com complexo avidina-biotina-peroxidase. A detecção da reação foi feita com o AEC (Vector). A imuno-histoquímica revelou a presença de EGF e do IGF-1 no ovário da cadela. O EGF foi imunolocalizado no citoplasma das células foliculares (CF) e nos oócitos de folículos secundários e terciários e também na parede vascular, nos cordões de células da granulosa e nas células luteínicas (CL), enquanto que o IGF-1, nos núcleos das mesmas estruturas e também no epitélio superficial, estroma ovariano, túbulos corticais, endotélio vascular, CF de folículos primários, células da teca e oócitos de folículos primordiais e primários.

Palavras – chave: **oócito, maturação, cadelas, fator de crescimento.**

Immunolocalization of the insulin like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF) in canine ovaries and their effects on *in vitro* maturation (IVM): nuclear evaluation

ABSTRACT- The aim of the present study was to assess the effect of the addition of EGF or IGF-1 to the culture medium TCM 199 on nuclear maturation of canine oocytes and to determine the distribution of these growth factors in the ovary of the bitch. 787 cumulus-oocyte complexes (COCs) were sampled during different phases of the oestral cycle from 34 bitches submitted to elective ovariohysterectomy. The COCs were distributed into three groups: A (TCM 199, n= 199); B (TCM 199 + 100ng/ml of EGF, n=208) and; C (TCM 199 + 100ng/ml of IGF-1, n=204). Following 96 hours of incubation at 38 °C, in sterile atmosphere with 5% CO₂, the nuclear maturation stage was evaluated following bisbenzimidazole 33342 (50%) or 4',6-Diamidino-2-phenylindole staining (50%). The addition of EGF or IGF-1 to the TCM 199 did not favour the IVM of canine oocytes. The bisbenzimidazole 33342 staining was better than 4',6-Diamidino-2-phenylindole staining in the assessment of nuclear maturation stage of canine oocytes. . Reproductive tracts from 34 bitches at the different phases of the estrous cycle were collected, fixed and processed with paraffin embedding. Sections were cut, mounted, dried, deparaffinized and rehydrated. Immunocytochemistry was performed using a dilution of the following antisera: anti-EGF-pc (Ab-3, Calbiochem) and Anti-IGF-1-pc (Ab-2, Calbiochem). Samples were incubated overnight. Primary antibody binding was detected using a biotinylated secondary goat-anti-rabbit or rabbit anti-goat IgG with avidin-biotin-peroxidase complexing. The detection reagent was AEC (Vector). Immunohistochemistry revealed the presence of EGF and IGF-1 in the ovary of the bitch. EGF was localized in the cytoplasm, while IGF-1 staining was nuclear. EGF was immunolocalized in the follicular cells (FC) and in the oocytes of secondary and tertiary follicles, as well as, in the vascular wall, granulosa cells strings and in the luteal cells (LC). IGF-1 was immunolocalized in the same structures and in the superficial epithelium, stroma, cortical tubules, FC of primary follicles, thecal cells and oocytes primordial and primary follicles.

Keywords: oocytes, maturation, bitches and growth factor

1. INTRODUÇÃO

A partir de 1990, com o início do interesse da comunidade científica pela preservação de espécies ameaçadas de extinção, ocorreu um grande desenvolvimento das biotecnologias da reprodução em carnívoros (LUVONI, 2000). Desde então, canídeos e felídeos domésticos são utilizados como modelos experimentais (DURRANT et al., 1998).

Em canídeos, a maturação *in vitro* (MIV) apresenta taxas limitadas, com valores que variam de 0 a 58% (FARSTAD, 2000). LUVONI (2000) refere taxas ainda piores, que giram em torno de 20%, enquanto que, em felinos, cerca de 75% dos oócitos completam a maturação (NAGANO et al., 2008).

Algumas peculiaridades da biologia reprodutiva das cadelas têm sido responsabilizadas por estas baixas taxas de maturação. A luteinização pré-ovulatória, que é marcada por uma inversão na concentração hormonal no final do proestro e início do estro, havendo um crescente aumento nos níveis de progesterona e decréscimo nas concentrações de estrógeno, expõe o oócito a elevadas concentrações intra-foliculares de progesterona, as quais atingem 7700 ng/mL (LUVONI et al., 2005).

Outra particularidade da cadela é que o oócito é ovulado em estágio imaturo, no início da primeira divisão meiótica, na fase de vesícula germinativa (VG), portanto, os estágios subseqüentes da maturação meiótica, como quebra da vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI), anáfase I, telófase I e extrusão do primeiro corpúsculo polar na metáfase II (MII), assim como a fecundação, ocorrem no oviduto. Tal peculiaridade justifica a importância do ambiente oviductal para a maturação oocitária canina, pois o oviduto é responsável por sustentar durante um extenso período, a sobrevivência dos oócitos liberados ainda imaturos até completarem o seu desenvolvimento, serem fecundados e atingirem o estágio de blastocisto (FARSTAD et al., 1989; LUVONI et al., 2005). Em outras espécies de mamíferos o oócito em fase de vesícula germinativa sofre reinício da meiose nas etapas finais da maturação folicular, sendo ovulado em metáfase II (FARSTAD et al., 1989; LUVONI et al., 2005).

Tendo em vista os poucos conhecimentos sobre a biologia da reprodução na espécie canina, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito dos fatores de crescimento IGF-I e EGF sobre a maturação de oócitos caninos, bem como imunolocalizar e quantificar esses fatores de crescimento no ovário através da imuno-histoquímica, poderá subsidiar pesquisas na área de biotecnologia da reprodução em canídeos domésticos e silvestres.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Meios de transporte de ovários e obtenção dos oócitos

Os ovários quando retirados do organismo vivo necessitam ser mantidos em condições adequadas. Diversos meios de preservação e transporte podem ser adotados, tais como: solução salina a 35°C (OTOI et al., 2000) e 38 °C (HAY et al., 1997), solução salina suplementada com gentamicina a 37°C (HEWITT & ENGLAND, 1997), PBS com penicilina e estreptomicina a 39°C (HEWITT & ENGLAND, 1997; HEWITT & ENGLAND, 1998a; HEWITT & ENGLAND, 1998b) e solução salina 0,9% suplementada com penicilina G sódica, sulfato estreptomicina e anfotericina B (NICKSON et al., 1993; HEWITT et al., 1998).

Os oócitos são obtidos principalmente por *slicing* ou fatiamento do ovário (NICKSON et al., 1993), e por digestão enzimática (BOLAMBA et al., 2002). Essas duas técnicas apresentam um maior número de oócitos recuperados quando comparadas à técnica de aspiração. Pelo fato dos ovários e folículos dos carnívoros domésticos possuírem um tamanho pequeno e os folículos tornarem-se visíveis apenas poucos dias antes da ovulação, a aspiração se torna de difícil execução (OTOI et al 2000). A técnica de digestão enzimática, apesar de apresentar reduzido número de oócitos degenerados, causa muitos danos às células da granulosa (BOLAMBA et al., 2002).

Para lavagem dos ovários e retirada dos oócitos, diversos meios são referidos pela literatura científica: lavagem dos ovários em solução salina suplementada com

gentamicina a 37°C e manutenção dos oócitos retirados por punção folicular em meio TYH (solução Krebs-Ringer bicarbonato modificada) com 10% de soro fetal bovino inativado e sulfato de gentamicina (YAMADA et al., 1992); lavagem dos ovários em PBS a 37°C e dos oócitos retirados por fatiamento em meio TCM199 com sais de Earle, HEPES, L-glutamina e sulfato de gentamicina (HAY et al., 1997); fatiamento em PBS com gentamicina (CONCANNON et al., 1989); ovários fatiados em PBS com 0,5% de albumina sérica bovina (NICKSON, et al., 1993) , lavagem e fatiamento dos ovários em TCM 199 com sais Earle, HEPES, penicilina, sulfato de estreptomicina e bicarbonato de sódio (HEWITT & ENGLAND, 1997; DURRANT et al., 1998; HEWITT & ENGLAND, 1998a); lavagem dos ovários e obtenção dos oócitos em PBS com 0,4% de BSA (OTOI et al., 2000); manutenção e fatiamento dos ovários em TCM 199 com 20% soro fetal bovino inativado, penicilina, estreptomicina e bicarbonato de sódio a 39°C (HEWITT & ENGLAND, 1998a).

É possível utilizar alternativamente soluções de digestão como, por exemplo, meio BWW (Briggers-Whitten-Whittingham) modificado, sem BSA, contendo collagenase e Dnase, durante 1 hora a 37°C, para fragmentos ovarianos de 1-2mm. Neste trabalho, os autores compararam três protocolos de digestão para recuperação de folículos de tecido ovariano, verificando que o protocolo de digestão seguido de refrigeração a 4°C *overnight* apresentou a menor porcentagem de oócitos degenerados, porém com folículos apresentando oócitos com camadas de células da granulosa danificadas ou ausentes (HEWITT et al., 1998).

STROM HOLST et al. (2001) e RODRIGUES & RODRIGUES (2003), relataram que não existe diferença significativa com relação ao número de oócitos obtidos entre animais de raça pura e sem raça definida e entre cadelas de diferentes pesos corporais. RODRIGUES & RODRIGUES (2003) demonstraram ainda que quanto maior é a idade da cadela, menor é a taxa de oócitos recuperados. Quanto à influência da fase do ciclo estral na recuperação de oócitos, os resultados são controversos; alguns autores referem que há uma tendência para uma maior taxa de oócitos recuperados durante a fase folicular do ciclo estral (STROM HOLST et al.,2001), porém RIBEIRO (2007)

demonstrou que não há diferença significativa. Em seu estudo apenas encontrou tal correlação nos animais em que o estro foi induzido hormonalmente.

2.2. Seleção dos oócitos

Uma particularidade dos oócitos de cadelas é que estes apresentam uma grande quantidade de material lipídico, o que confere ao citoplasma uma coloração mais escura quando comparados à oócitos de outras espécies de mamíferos (LUVONI et al., 2005). Somente podem ser selecionados para a MIV de cadelas, os complexos oócitos-*cumulus* (COCs) grau 1, ou seja, aqueles com citoplasma uniformemente escuro, zona pelúcida intacta, diâmetro superior a 100 μm e circundados por duas ou mais camadas de células do *cumulus* (BOLAMBA et al., 1998).

Além dos fatores morfológicos acima citados, outros são importantes na seleção de oócitos com habilidade para reassumir a meiose, como a idade da doadora e a fase do ciclo estral. Segundo HEWITT & ENGLAND (1998a), oócitos obtidos de fêmeas maiores que sete anos têm menor habilidade para reassumir a meiose. Embora alguns autores tenham observado que a fase do ciclo estral da fêmea não influencia a maturação *in vitro* de oócitos de cadelas (HEWITT & ENGLAND, 1997; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003; RIBEIRO, 2007), recentemente, têm-se dado muito importância a este fato, e alguns trabalhos demonstraram que os índices de maturação foram melhores quando as doadoras estavam em estro ou proestro quando comparadas com doadoras em anestro ou diestro (OTOI et al., 2001; LUVONI et al., 2001; LUVONI et al., 2005; CUI, et al., 2006). Isto pode ser explicado devido às junções do tipo *gap* permanecerem fechadas em COCs obtidos de fêmeas na fase luteal do ciclo estral, e abertas em COCs obtidos na fase folicular (LUVONI et al., 2005).

2.3. Meios de maturação

Os meios de maturação geralmente são adaptações daqueles utilizados em bovinos, sendo assim, os mais utilizados são o SOF, "Synthetic Oviduct Fluid", (HEWITT & ENGLAND, 1999; BOLAMBA et al., 2002; MARTINS, 2005, MACHADO et

al., 2007) e, principalmente o TCM 199, "Tissue Culture Medium" 199 (OTOI et al., 2000; SONGSASEN et al., 2001; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003; APPARICIO-FERREIRA, 2006; PIRES, 2007; RIBEIRO, 2007), acrescidos de fatores de crescimento, proteínas, antibióticos, hormônios e antioxidantes.

Com o objetivo de mimetizar o ambiente oviductal, alguns pesquisadores estudaram o co-cultivo de oócitos em células do oviduto de cadelas e demonstraram que este procedimento teve um efeito positivo sobre a MIV de oócitos de cadelas. (BOGLIOLO et al., 2002)

Com base na fisiologia reprodutiva peculiar da cadela, onde os oócitos são expostos a elevadas concentrações de progesterona no folículo pré-ovulatório, muitos estudos foram realizados com suplementação de hormônios esteróides (estrógeno e progesterona) aos meios de maturação. VANNUCCI et al. (2003) verificaram que a adição de estrógeno e progesterona ao meio de maturação apresentou efeito benéfico sobre a MIV de oócitos de cadelas, o mesmo foi encontrado por APPARÍCIO-FERREIRA (2006), ao adicionar hCG, progesterona e estradiol. Em contrapartida, RIBEIRO (2007) relatou que a adição de progesterona não apresentou efeito positivo sobre a MIV.

Os radicais livres produzidos pelo metabolismo oxidativo são prejudiciais ao processo de MIV (DEW, 2001). Visando diminuir os danos causados por estas substâncias, alguns estudos com a adição de compostos antioxidantes ao meio de cultivo foram realizados. KIM et al. (2004) concluíram que a adição de β -mercaptoethanol ao meio de cultivo melhorou as taxas de MIV em cadelas, porém, PIRES (2007) ao estudar os efeitos da cisteína e da cisteamina, verificou que não houve efeito positivo.

Alguns pesquisadores acreditam que os espermatozóides apresentam papel importante na retomada da meiose de oócitos de cadelas durante o processo de maturação *in vivo*, sendo assim, estudos com meios de cultivos acrescidos de espermatozóides foram desenvolvidos, porém não foi verificado efeito positivo sobre a MIV (SAINT DIZIER et al., 2001).

Entre os fatores de crescimento relacionados com a ação na maturação nuclear do oócito, estão o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento derivado da insulina (IGF-I) e o fator de crescimento epidermal (EGF) (PARIA & DEY, 1990; HEYNER et al., 1993; BORTOLOTTI et al., 2001; KITTYANANT et al., 2003).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF I e II) são peptídeos com similaridades estruturais à pró-insulina, conhecidos como somatomedinas (MACHADO et al., 2007). Eles podem participar na maturação do oócito, ovulação, implantação e embriogênese (MACHADO et al., 2007) e sabidamente estimulam a diferenciação e proliferação das células da granulosa em ratas, assim como melhoram a sobrevivência dessas células, por controlarem o mecanismo de apoptose (MAZERBOURG et al., 2003).

O EGF é um polipeptídeo de cadeia simples e um dos muitos fatores de crescimento encontrados 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), e assim como o IGF-1, sabe-se que o EGF possui efeito anti-apoptótico em tecido ovariano, ou seja, exerce papel fundamental na sobrevivência das células (LUCIANO et al., 2000). Localmente, ambos (EGF e IGF-1) produzem efeitos parácrinos e autócrinos sobre a proliferação celular (KIM et al., 2004; MACHADO et al., 2007).

In vitro, o EGF e o IGF-1 melhoram a MIV de oócitos de mamíferos por meio da ativação do fator promotor da meiose (MPF) e de outras Kinases, como a proteína ativadora da mitose (MAP-Kinase) (SAKAGUCHI et al., 2002).

CUI et al. (2006) e KIM et al. (2004) demonstraram que o EGF melhorou as taxas de maturação, quando utilizados oócitos de cadelas em estro e 72 horas de maturação. O EGF, em combinação com tratamento hormonal, aumentou a expansão das células do *cumulus* e foi observada uma tendência em melhorar as taxas de retomada da meiose na MIV de oócitos caninos. Entretanto, o EGF sem tratamento hormonal não apresentou efeitos benéficos na MIV de oócitos caninos (BOLAMBA et al., 2006). MACHADO et al. (2007) também trabalhando com MIV de oócitos de cadelas

demonstraram que a adição do IGF-1 ao meio SOF não aumentou as taxas de maturação.

Muitas pesquisas foram realizadas com MIV e fatores de crescimento em diferentes espécies. Em búfalas, a adição de EGF ou IGF-1 ao meio de maturação melhorou os índices de maturação, de fertilização e desenvolvimento de embriões *in vitro*, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a combinação do EGF e IGF-1 (PUROHIT et al., 2005). Porém, em outro trabalho com búfalas, foi relatado que o IGF-1 e o EGF não melhoraram a MIV (SINGHAL et al., 2009).

Em bovinos, o EGF e o IGF-1, adicionados juntos ao meio de maturação aceleraram a progressão na meiose na MIV, porém não aumentaram a taxa de clivagem (SAKAGUCH et al., 2000). Em um experimento com ovinos, foi encontrado que o IGF-1 não melhorou os índices de MIV, ao contrário do EGF que apresentou efeito benéfico (GULER et al., 2000).

Em bovinos a adição de PDGF aumentou as taxas de blastocisto ou de desenvolvimento embrionário (BORTOLOTTTO et al., 2001). KITIYANANT et al. (2003) demonstraram que, em felinos, a maturação é estimulada pela adição do IGF-I ao meio de cultivo.

SIROTKIN et al. (2000), em um estudo de MIV de oócitos em suínos, com meio TCM 199 suplementado com IGF-I, IGF-II e EGF, separadamente, encontrou acréscimo na taxa de MIV. SOMMER et al. (1992) e DING & FOXCROFT (1994) também demonstraram em suínos que o EGF e o TGF-ALFA estimulam a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos.

Os receptores para a insulina e IGF-I possuem estruturas similares e afinidade cruzada, no entanto, a insulina possui um efeito metabólico muito mais potente do que o IGF-I (HADLEY, 1988; HEYNER et al., 1993; BORTOLOTTTO et al., 2001). Em primatas foi demonstrado que o IGF-I trabalha em sinergia com o hormônio luteinizante na produção de andrógenos pelas células da teca e na indução da atividade da aromatase das células da granulosa (ZELZNIK & BENYO, 1994).

Na foliculogênese, a insulina tem ação na manutenção e crescimento dos folículos primordiais e primários e, em baixas concentrações, pode aumentar as taxas

de formação de folículos primários (ZELZNIK & BENYO, 1994). Em ratos, a insulina tem ação sobre as células da granulosa estimulando a atividade esteroideogênica (YU & ROY, 1999). Em outro experimento com bovinos ficou demonstrado que a insulina estimula o desenvolvimento de embriões de oito células até a fase de blastocisto eclodido (HEYNER et al., 1993). Nas fases de mórula e blastocisto, a insulina estimula a síntese de RNA e DNA do embrião (HEYNER et al., 1993).

2.4. Tempo de cultivo

O tempo de cultivo dos oócitos pode chegar até a 120 horas (LUVONI et al., 2005). Quanto maior o tempo utilizado na MIV, menores serão os achados de VG e maiores os de QVG e MII, porém maiores serão também as porcentagens de oócitos degenerados (LUVONI et al., 2005). Algumas pesquisas relataram que o tempo de 72 horas seria o ideal para MIV de oócitos de cadelas (LUVONI et al., 2005).

2.5. Formas de avaliação

A eficiência da MIV deve ser avaliada com base na maturação nuclear e citoplasmática do oócito (LUVONI et al., 2005; APPARÍCIO-FERREIRA, 2006; LANDIM-ALVARENGA, 2006, MACHADO et al. 2007; PIRES, 2007; RIBEIRO, 2007,).

Estruturalmente, os oócitos são compostos por núcleo (vesícula germinativa), nucléolo, mitocôndrias, complexo de golgi, grânulos corticais, ribossomos, fibrilas citoplasmáticas e zona pelúcida (LUVONI et al., 2005; APPARÍCIO-FERREIRA, 2006; ALVARENGA, 2006, MACHADO et al., 2007; PIRES, 2007; RIBEIRO, 2007). Junções comunicantes são observadas entre o oócito e as células da granulosa, que formam a coroa radiata, estabelecidas antes mesmo da formação da zona pelúcida e, são responsáveis pela nutrição do oócito (GREENWALD & TERRANOVA, 1988; LUVONI et al., 2005; LANDIM-ALVARENGA, 2006). A zona pelúcida, de natureza glicoprotéica, possui origem controversa nas diversas espécies de animais, podendo ser derivada das células foliculares ou do oócito ou mesmo de ambas estruturas (GREENWALD & TERRANOVA, 1988; LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Quando retirados dos folículos e maturados *in vitro*, os oócitos da maioria dos mamíferos retomam a meiose, o que não acontece com a cadela (GREENWALD & TERRANOVA, 1988; LUVONI et al., 2005; LANDIM-ALVARENGA, 2006). O processo de maturação nuclear do oócito compreende o término da primeira redução meiótica, incluindo as de progressão de diplóteno da primeira prófase meiótica até metáfase II (LANDIM-ALVARENGA, 2006). *In vivo*, esse processo tem início simultaneamente com o pico pré-ovulatório de LH e, *in vitro*, com a retirada do oócito do ambiente folicular, em outros mamíferos que não as cadelas (HEWITT & ENGLAND, 1997, HEWITT & ENGLAND, 1998, OTOI et al., 2000; ALVARENGA, 2006). Nas cadelas, o oócito completa a primeira divisão meiótica em dois a cinco dias após a ovulação e, após fecundação, desenvolve-se até blastocisto no ambiente tubárico (TSUTSUI, 1989, HEWITT & ENGLAND, 1998). O espermatozóide pode manter-se viável por até seis dias após a cobertura e pode penetrar oócitos imaturos (HEWITT & ENGLAND, 1998).

A avaliação da maturação nuclear deve ser feita utilizando-se a técnica de fluorescência, devido à grande quantidade de material lipídico presente em oócitos de canídeos (BOLAMBA et al., 2002). Após o tempo de cultivo, as células do *cumulus* são retiradas, por meio de sucessivas passagens em hialuronidase 0,2%. O oócito desnudo é então corado com bisbenzimidide (LUVONI et al., 2005; APPARÍCIO-FERREIRA, 2006; ALVARENGA, 2006, MACHADO et al., 2007; PIRES, 2007; RIBEIRO, 2007).

Para a classificação do grau de maturação, preconiza-se o seguinte padrão: vesícula germinativa (VG), presença de núcleo vesicular com cromossomos pouco condensados; quebra da vesícula germinativa (QVG): cromossomos apresentam algum grau de condensação com dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular; metáfase I (MI): cromossomos atingem grau mais avançado de condensação, não sendo possível a visualização individual dos cromossomos; metáfase II (MII): apresentam um grupo denso de cromossomos formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo, mais afastado, caracterizado pela placa metafisária; e degenerados ou não passíveis de identificação (HEWITT & ENGLAND, 1998; LUVONI et al., 2005; APPARÍCIO-FERREIRA, 2006; ALVARENGA, 2006; MACHADO et al. 2007; PIRES, 2007; RIBEIRO, 2007).

Para a avaliação da maturação citoplasmática são consideradas algumas características das organelas das células, tais como: posição dos grânulos citoplasmáticos e das mitocôndrias; para esta finalidade, deve ser retirada a zona pelúcida do oócito desnudo para posterior coloração dos grânulos corticais em *solução Lens culinaris*. Os grânulos corticais de oócitos maduros estão localizados na periferia do oócito, ao passo que em oócitos imaturos estão na região central (MACHADO et al., 2007; APPARÍCIO-FERREIRA, 2006).

2.6. Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ), seguimento moderno da histoquímica, é um conjunto de metodologias relativamente recentes cuja crescente utilização tem provocado grande impacto na patologia humana e veterinária, devido a sua elevada sensibilidade e especificidade (OLIVEIRA, 1998) .

Teve origem na década de 40, com o desenvolvimento das técnicas de imunofluorescência (COONS et al., 1941; COONS, 1961). Entretanto, o fato de a imunofluorescência possuir várias limitações (requer equipamentos de alto custo, necessidade de material fresco ou especialmente preparado, possibilidade limitada de conservação do material e pouca definição da morfologia celular e tissular) estimulou a busca de uma técnica alternativa que fosse compatível com o processamento histológico de rotina. Além de combinar técnicas anatômicas, imunológicas e bioquímicas, a IHQ tem como principais vantagens a localização de componentes teciduais definidos (*in situ*), mediante o emprego de anticorpos específicos e de moléculas marcadoras e a utilização de amostras conservadas por diferentes meios, como por exemplo fixadas em formol, congeladas, dentre outras (GIMENO, 1995).

A IHQ é um método eficaz, por permitir a localização de substâncias como proteínas séricas, imunoglobulinas, enzimas, hormônios e patógenos, em tecidos íntegros (OLIVEIRA, 2005).

O EGF foi isolado pela primeira vez na glândula salivar de rato (COHEN, 1962). EGF e TGF-ALFA pertencem à mesma família, apresentam de 40 a 50% de homologia

estrutural e ambos se ligam ao EGF-R e induzem efeitos biológicos semelhantes, como divisão celular, diferenciação e sobrevivência (DERYNCK et al., 1984).

Não há relatos na literatura sobre imunolocalização do EGF e IGF-1 em ovários de cadelas. TAMADA et al. (2005) demonstraram que o receptor do EGF e o TGF-ALFA estão presentes no lúmen e no epitélio glandular do útero de cadelas e, concluíram que esta marcação foi mais intensa durante o estro. Outros autores concluíram que o IGF-1 está presente em altas concentrações no epitélio do endométrio uterino de cadelas com piometra, e assim, pode estar envolvido na patogênese da piometra (DE COCK et al., 2002).

REEKA et al. (1998) localizaram o EGF, TGF-ALFA e o EGF-R em ovários humanos e relataram que o EGF e TGF-ALFA apresentaram a mesma distribuição, sendo localizados nas células da granulosa de folículos antrais, pré-antrais e pré-ovulatórios e também nas células da teca e células luteínicas, enquanto que o EGF-R esteve presente apenas nas células da granulosa de folículos antrais.

OSCAKIR et al. (2005) localizaram o EGF e o TGF-ALFA em ovários de ratas, e descreveram que estes fatores estão presentes no endotélio vascular, estroma ovariano, células da granulosa e células luteínicas. FUKUMATSU et al. (1995) imunolocalizaram o EGF em ovários de ratas e relataram marcação positiva apenas nas células da granulosa e antro folicular.

ERGIN et al. (2008) mostraram que o IGF-1 está presente em ovários de ratas nas células da granulosa, células da teca, células luteínicas e nos oócitos. GIORDANO & OLIVEIRA (2004) concluíram que os receptores do IGF-1 estão presentes em maior quantidade nas células da granulosa de ovários de mulheres com síndrome do ovário policístico do que em ovários normais.

O EGF, TGF-ALFA, IGF-1 e seus receptores nunca foram imunolocalizados nos ovários de cadelas, e como foi descrito anteriormente, estes fatores de crescimento possuem muitas funções na reprodução, sendo assim, a imunolocalização destes poderá ajudar a elucidar o complexo mecanismo de desenvolvimento folicular e maturação oocitária na cadela.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito dos fatores de crescimento IGF-I e EGF sobre a maturação de oócitos caninos.

Avaliar a eficácia da coloração DAPI na observação dos estágios de maturação nuclear de oócitos caninos.

Imunolocalizar esses fatores de crescimento, assim como seus receptores, e também o TGF-ALFA, em ovários de cadelas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Colheita dos ovários

Os ovários de 34 cadelas de diferentes raças, com idades variando de oito meses a sete anos, provenientes de ovário-histerectomias eletivas, realizadas no Projeto de Extensão Universitária “Controle Reprodutivo de Caninos e Felinos no Município de Jaboticabal” e no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, foram colhidos, liberados das bolsas ovarianas, lavados e acondicionados em solução salina (NaCl a 0,9%) a 37°C. Em seguida, foram transportados ao Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal.

Os históricos reprodutivos de cada cadela foram informados pelos seus respectivos proprietários antes de cada cirurgia. A fase do ciclo estral foi determinada por meio do histórico reprodutivo, comportamento do animal, observação macroscópica dos ovários, dosagem de progesterona e citologia vaginal corada pelo método rápido de Panótico.

4.2. Colheita dos oócitos

No laboratório, os ovários foram transferidos para frascos estéreis contendo solução PBS, acrescida de 10% de soro fetal bovino (SFB), em temperatura de 37°C.

Em seguida foram colocados em placa de Petri com a mesma solução e após foram cortados com lâmina de bisturi nº. 24, em espaços de aproximadamente 2 mm para liberação dos oócitos. Os oócitos foram lavados em solução comercial (*tissue culture medium* 199, M5017, Sigma-Aldrich) - HEPES acrescido de sulfato de amicacina, solução de piruvato sódico (P-4562, Sigma-Aldrich) e SFB para posterior seleção (Figura 1).



Figura 1 – Fotografia do fatiamento dos ovários de cadelas após a coleta e placas de cultivo 35 x 10mm (setas) contendo solução para lavagem e seleção dos oócitos. Jaboticabal-SP, 2012.

Foram selecionados 840 complexos *cumulus*-oócitos (COCs) classificados como Grau I (Figura 2), ou seja, aqueles COCs com ooplasma uniformemente escuro, com zona pelúcida intacta, com diâmetro superior a 100 μm e circundados por uma ou mais camadas de células do *cumulus*. Estes COCs foram aleatoriamente agrupados nos tratamentos controle (meio de maturação TCM 199, n=199), IGF-I (TCM 199 + IGF-I, n=204), EGF (TCM 199 + EGF, n=208) e grupo M0 (momento zero, n=229), sendo este último (M0) feito para avaliar o grau de maturação nuclear no momento da colheita dos mesmos.



Figura 2 - Fotomicrografia de COCs Grau 1. Note ooplasma uniformemente escuro, com zona pelúcida intacta, circundado por uma ou mais camadas de células do *cumulus* e com diâmetro superior a 100 μm . Microscópio estereoscópio, aumento de 4x. Jaboticabal-SP, 2012.

4.3. Maturação nuclear *In Vitro* de oócitos caninos.

Para a avaliação do efeito do fator de crescimento derivado da insulina tipo I (IGF-I, I-3769, Sigma–Aldrich) e epidermal (EGF, E-9644, Sigma–Aldrich), os COC's (840) foram alocados em placas de cultivo (*nunc*), agrupadas em no máximo 10 células por cavidade, sendo que cada placa continha oócitos de apenas uma cadela. Para cada cavidade contendo 500 μl do meio de maturação (TCM 199), foi acrescentado 100 ng/ml de IGF-I (grupo IGF-I, n=204) ou dose pré-determinada de EGF, também 100 ng/ml (grupo EGF, n=208), os quais foram comparados ao meio sem fator de crescimento (grupo controle, n=199). Os COCs ficaram incubados a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO_2 , durante 96 horas (Figura 3). Os meios de maturação dos três grupos continham ainda FSH, LH e estradiol.



Figura 3 – Fotografia exemplificando a placa de cultivo tipo nunc com meio de maturação, onde os COCs Grau I ficaram incubados por 96 horas em estufa a 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂. O exemplo acima se refere a uma cadela no estro, da qual foram obtidos 40 oócitos grau 1, sendo distribuídos 10 oócitos para cada grupo (M0, CON, EGF e IGF-1), vale ressaltar que o grupo M0 não sofre maturação, portanto não encontra-se representado na placa. Jaboticabal-SP, 2012.

4.4. Avaliação da maturação nuclear

No M0 (grupo M0, n=229) e após o tempo de cultivo (96 horas) as células do *cumulus* foram removidas dos oócitos (Figura 4), por meio de repetidas passagens em hialuronidase 0,2%. A metade dos oócitos desnudos foram corados aleatoriamente com HOESCHT (Bisbenzimidaz H33342 Fluorocromo, B2261, Sigma-Aldrich) e a outra metade corados por DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, D9564, Sigma-Aldrich). A avaliação do estágio de maturação nuclear foi realizada em microscópio de epifluorescência, com luz ultravioleta e filtro de 365 a 480 nm.



Figura 4 – Fotomicrografia dos oócitos de cadelas após remoção das células do *cumulus*. Microscópio estereoscópio, aumento de 4x. Jaboticabal-SP, 2012.

Os COC's do grupo controle (n=199) foram processados e cultivados da mesma maneira que os grupos em que os COC's foram tratados.

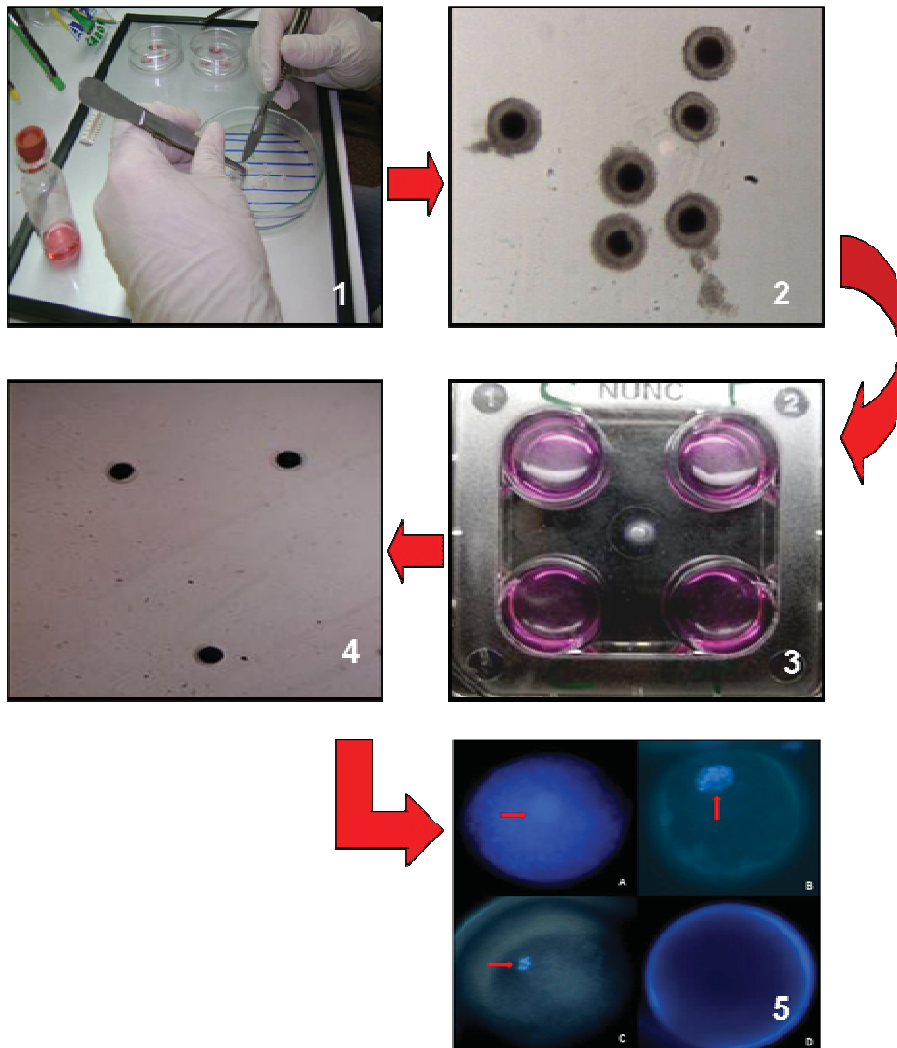


Figura 5 – Esquema representativo de todo o processo de MIV. (1) *Slicing*, (2) oócitos grau 1, (3) Placa nunc com os meios de maturação, (4) oócitos desnudos, (5) avaliação nuclear da MIV. Jaboticabal-SP, 2012.

4.5. Imuno-histoquímica

Os fragmentos de ovários obtidos das 34 cadelas deste estudo foram submetidos aos procedimentos de rotina de fixação e inclusão em parafina do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP. Cortes de cinco micrômetros de espessura foram confeccionados e examinados por meio da coloração Hematoxilina e Eosina.

Cortes de três micrômetros de espessura foram montados em lâminas pré-tratadas com Poly-L-Lisina (cód. P4832 – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO EUA) para a realização da técnica de imuno-histoquímica.

Todo o treinamento e padronização da técnica foi feita no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Complutense de Madrid-Espanha, durante estágio de doutoramento no exterior (PDEE-CAPEs), sob a orientação do Prof. Dr. José Félix Pérez Gutiérrez.

A desparafinização e a reidratação foram feitas em baterias de xilóis e álcoois em concentrações decrescentes. Após lavagem em água destilada, receberam tratamento com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (2,4%), para bloqueio da peroxidase endógena, durante 10 minutos. A recuperação antigênica foi feita em panela de pressão durante 10 minutos em solução tampão de citrato de sódio (pH 6).

O bloqueio das reações inespecíficas para os anticorpos anti-EGF, anti-EGF-R e anti-TGF-ALFA foi feito com tampão de bloqueio de kit comercial (Vector elite, PK6101, Rabbit IgG) durante 30 minutos. Para os anticorpos anti-IGF-1 e anti-IGF-1R foi utilizado albumina sérica bovina (BSA-SIGMA), incubados durante 30 minutos. Em seguida, foram incubados 18 horas em câmara úmida a 4 °C com os respectivos anticorpos primários e suas diluições (Quadro 1).

Quadro 1- Anticorpos primários e concentrações utilizadas na imuno-histoquímica. Jaboticabal-SP, 2012.

Anticorpo primário	Concentração utilizada
Anti-EGF; Ab-3; Rabbit pAb; cat. No PC08; Calbiochem	1:20 do anticorpo em PBT
Anti-EGF-R; Ab-5; Mouse mab; cat. No GR15; Calbiochem	1:20 do anticorpo em PBT
Anti-TGF-ALFA; Ab-2; Mouse mab 213-4.4; cat. No GF10; Calbiochem	1:20 do anticorpo em PBT
Anti-IGF-1; (Ab-2); goat pAb; Cat. No PC195L Calbiochem	10 microgramas/ml
Anti-IGF-1R; Lyophilized; 100 ug; Ab-2; goat pAb; Cat. No PC196L Calbiochem	5 microgramas/ml

Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário biotilado (Quadro 2). Para os anticorpos anti-IGF-1R e anti-TGF-ALFA as amostras ficaram incubadas durante 30 minutos com o anticorpo secundário, enquanto para os demais foi utilizado 40 minutos.

Quadro 2- Anticorpos secundários utilizados para cada anticorpo primário e as respectivas diluições. Jaboticabal-SP, 2012.

Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Diluição utilizada
Anti-EGF	Vector elite PK6101 Rabbit IgG	kit
Anti-EGF-R	Goat anti-Mouse IgG, H & L chain specific Biotin Conjugate, Calbiochem	1:100
Anti- TGF-ALFA	Goat anti-Mouse IgG, H & L chain specific Biotin Conjugate, Calbiochem	1:100
Anti-IGF-1	Rabbit Anti-goat IgG; Biotinylated; 500ug; Anaspec	10 microgramas/ml
Anti-IGF-1R	Rabbit Anti-goat IgG; Biotinylated; 500ug; Anaspec	10 microgramas/ml

Após, as amostras foram incubadas durante 30 minutos, para todos os anticorpos, com um conjugado de avidina-biotina-peroxidase (Elite ABC Kit-Vector laboratories). A reação foi revelada com o 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC Vector Laboratories.). Para os anticorpos anti-EGF e anti-EGF-R as amostras ficaram incubadas por 30 minutos com o AEC, enquanto que para o anti-IGF-1, anti-IGF-1R e anti-TGF-ALFA os tempos de incubação foram, respectivamente, 10, 2 e 5 minutos. Em seguida, as amostras foram contra-coradas com hematoxilina de carazzi, durante 1 minuto e lavadas em água corrente para imediata montagem das lamínas em meio aquoso utilizando Aquatex® (Merck).

O controle positivo utilizado para os anticorpos Anti-EGF-R, anti-TGF-ALFA e Anti-IGF-1 foi útero de cadela, já para o Anti-EGF foi glândula salivar de camundongo e para o Anti-IGF-1R foi testículo de rato.

Os controles negativos foram feitos com solução tampão fosfato (pH 7,2) ou imunoglobulina G das espécies dos anticorpos primários.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1. Maturação *in vitro*

A análise dos dados foi por meio do teste de Qui-quadrado (comparações entre os grupos, colorações, e entre grupos nas diferentes fases do ciclo estral), quando as frequências esperadas foram menores que 5, foi utilizado o teste exato de Fisher. Ambos os testes foram realizados com o auxílio do Software estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). O teste de Tukey foi utilizado para comparar a quantidade de COCs obtidos de cadelas de raça pura e sem raça definida e nas diferentes fases do ciclo estral. O nível de significância das análises foi de 5%.

5.2. Imuno-histoquímica

As preparações foram analisadas por meio de microscopia de luz, nas objetivas de 10, 40 e 100x, quanto à intensidade de coloração e porcentagem de células coradas (contagem de 100 células), sempre pelos mesmos dois avaliadores. O quadro 3 demonstra os escores para cada intensidade de coloração e porcentagem de células coradas (VERMEIRSCH et al., 2001; OLIVA-HERNÁNDEZ & PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008). Utilizou-se o programa estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) para a determinação da frequência de cada escore nas 34 amostras avaliadas para cada um dos cinco anticorpos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar cada estrutura dentro de um mesmo anticorpo, entre os anticorpos e entre as diferentes fases do ciclo estral para um mesmo anticorpo.

Quadro 3 – Escores dados para cada intensidade de coloração e porcentagem de células coradas em ovários de cadelas (VERMEIRSCH et al., 2001; OLIVA-HERNÁNDEZ & PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008). Jaboticabal-SP, 2012.

Escores	Intensidade de coloração	Porcentagem de células coradas
0	Não houve marcação	Não houve marcação
1	Leve	< 1% de células marcadas
2	Moderada	1-9% de células marcadas
3	Forte	10-32% de células marcadas
4	-	33-65% de células marcadas
5	-	> 65% de células marcadas

6. RESULTADOS

6.1. MIV

A maior parte dos COCs deste estudo foi obtida de cadelas sem raça definida (Tabela 1 e 2), e com idade variando de oito meses a sete anos (Tabela 3). Diferença não significativa ($p > 0,05$) foi observada na média de COCs obtidos entre cadelas sem raça definida e aqueles de raça pura. Também não houve diferença ($p > 0,05$) entre a média dos COCs obtidos de doadoras adultas e peri-púberes (Tabela 3).

Tabela 1- Distribuição de frequências racial e individual dos complexos *cumulus* oócitos caninos (COCs). Jaboticabal-SP, 2012.

Raças	Frequências (%)	COCs/Doadoras
SRD	24/34 (70,6)	674/24 (28,1)
Pit Bull	3/34 (8,9)	24/3 (8)
Cocker	2/34 (6,0)	52/2 (26)
Doberman	1/34 (2,9)	10/1 (10)
Fox paulistinha	1/34 (2,9)	23/1 (23)
São Bernardo	1/34 (2,9)	20/1 (20)
Poodle	1/34 (2,9)	9/1 (9)
Pastor alemão	1/34 (2,9)	28/1 (28)
Total	34/34 (100)	840/34 (24,7)

Tabela 2- Distribuição de frequências racial dos complexos *cumulus* oócitos caninos (COCs). Jaboticabal-SP, 2012.

Raças	Frequências (%)	COCs/Doadoras
SRD	24/34 (70,6)	674/24 (28,1) ^a
Raça Pura	10/34 (29,4)	166/10 (16,9) ^a
Total	34/34 (100)	840/34 (24,7)

Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Distribuição de frequências das doadoras e dos complexos *cumulus* oócitos caninos (COCs) por faixa etária. Jaboticabal-SP, 2012.

Faixa etária	Doadoras/Total (%)	COCs/Doadoras
Peri-púberes (8-10meses)	4/34 (11,76)	108/4 (27,0) ^a
Adultas (>10 meses)	30/34 (88,24)	732/30 (24,4) ^a
Total	34/34 (100)	840/34 (24,7)

Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Com relação à fase do ciclo estral, a maior parte dos COCs foi obtida de cadelas em anestro e diestro, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição de frequências das doadoras e dos complexos *cumulus* oócitos (COCs) caninos nas diferentes fases do ciclo estral. Jaboticabal-SP, 2012.

Fase do ciclo	Doadoras/Total (%)	COCs/Doadoras
Anestro	13/34 (38,2)	345/13 (26,5) ^a
Proestro	1/34 (3,0)	9/1 (9) ^a
Estro	8/34 (23,5)	178/8 (22,3) ^a
Diestro	12/34 (35,3)	308/12 (25,7) ^a
Total	34/34 (100)	840/34 (24,7)

Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

De um total de 840 oócitos grau I recuperados, 226 (26,9%) foram perdidos durante o procedimento de coloração nuclear (Tabela 5). As perdas ocorreram essencialmente durante a etapa da hialuronidase, enzima utilizada para remoção das células do *cumulus*, sendo que o meio IGF foi o tratamento que apresentou as maiores taxas de perda (32,84%) quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 6).

Tabela 5 – Frequência absoluta e relativa (%) de COCs recuperados de 34 fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Jaboticabal-SP, 2012.

Parâmetros	Frequências	
	Absoluta	Relativa (%)
COC Grau 1	840	100
Avaliados	614	73,1
Perdas	226	26,9

Tabela 6 – Frequência absoluta e relativa (%) de oócitos caninos perdidos durante o procedimento de coloração nuclear por tratamento de maturação oocitária. Jaboticabal-SP, 2012.

Nº de oócitos recuperados	Frequência absoluta e relativa (%) de oócitos perdidos				
	M0	CON	IGF	EGF	TOTAL
840	53 (23,14)	60 (30,15)	67 (32,84)	46 (22,14)	226 (26,9)

M0= momento zero de avaliação; CON= controle

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos tratados (IGF-1 e EGF) e o grupo controle com relação à maturação nuclear de oócitos avaliados após 96 horas (Tabelas, 7,9 e 10). Também não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos dentro de cada fase do ciclo estral e entre cada fase do ciclo estral (Tabela 8) .

Tabela 7 – Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados no M0 e após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados em cada meio de maturação, sendo CON (controle), IGF, EGF e M0. Jaboticabal-SP, 2012.

Parâmetros Avaliados	Frequência absoluta e relativa (%)			
	CON	IGF	EGF	M0
Total	139 (100)	137 (100)	162 (100)	176 (100)
VG	7 (5,04) ^a	8 (5,84) ^a	13 (8,03) ^a	17 (9,66) ^a
QVG	28 (20,24) ^a	23 (16,55) ^a	32 (19,75) ^a	41 (23,30) ^a
MI	11 (7,92) ^a	5 (3,62) ^a	10 (6,17) ^a	7 (3,98) ^a
MI	-	-	-	-
Degenerados	93 (66,90) ^a	101 (73,72) ^a	107 (66,05) ^a	111 (63,06) ^a

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

Tabela 8 – Frequência absoluta dos COCs grau I, avaliados no M0 e após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas no anestro, diestro e estro, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e degenerados em cada meio de maturação, sendo CON (controle), IGF, EGF e M0. Jaboticabal-SP, 2012.

	Anestro				Diestro				Estro			
	M0	CON	IGF	EGF	M0	CON	IGF	EGF	M0	CON	IGF	EGF
VG	7	4	6	5	6	2	2	7	4	0	0	1
QVG	18	13	13	13	11	12	7	12	12	3	3	7
MI	3	3	1	4	1	4	2	3	3	4	2	3
DEG	50	44	36	38	44	32	39	42	18	16	16	28
TOTAL	78	74	56	57	60	50	50	64	37	23	21	39

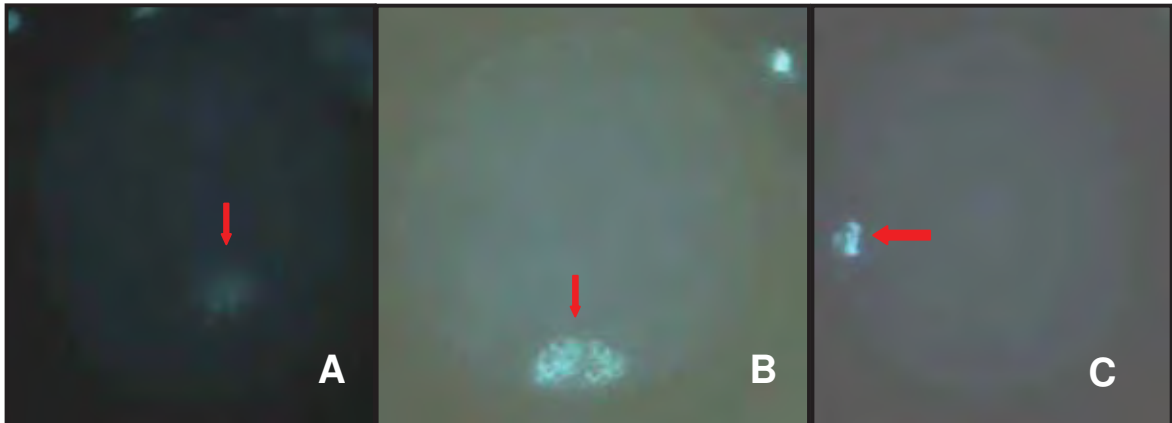


Figura 6 - Fotomicrografia de óócitos caninos corados pela técnica de fluorescência (Hoechst 33342) onde nas setas vermelhas são evidenciados: Vesícula germinativa (A), Quebra de vesícula germinativa (B) e Metáfase I (C). Jaboticabal-SP, 2012

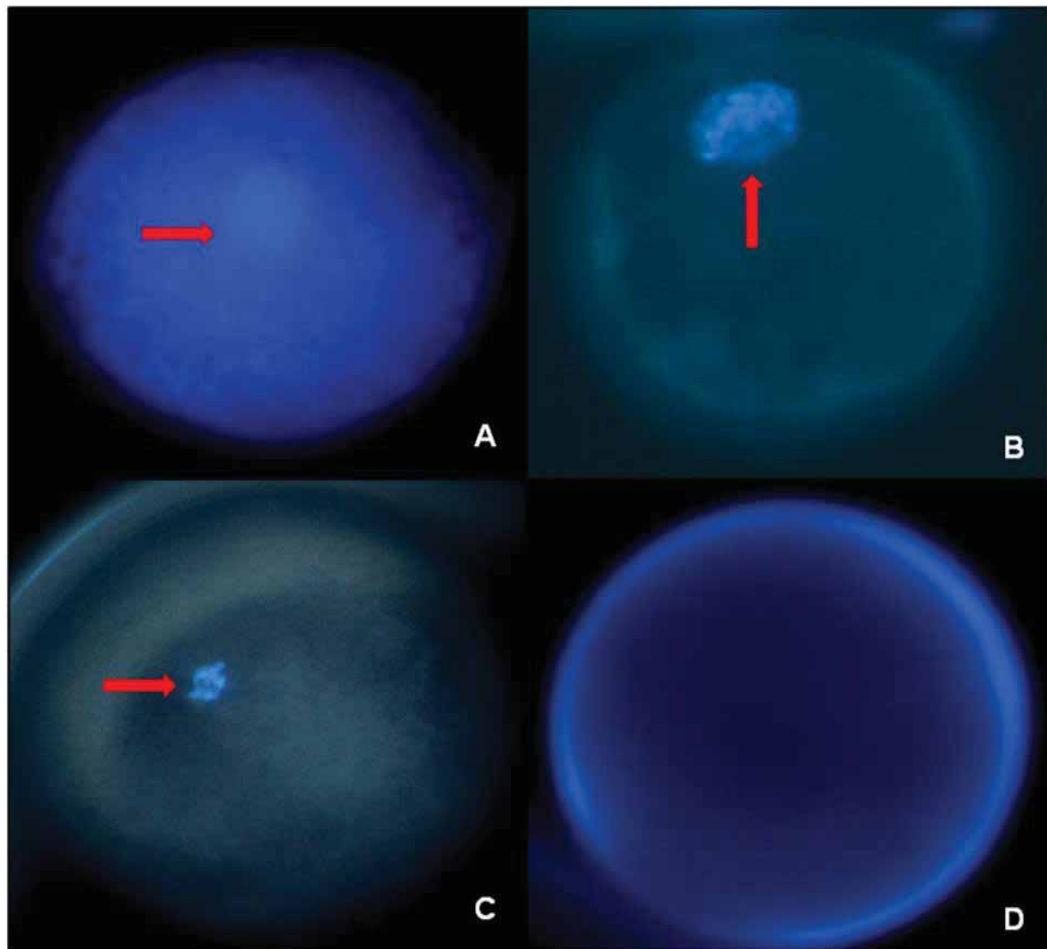


Figura 7 - Fotomicrografia de oócitos caninos corados pela técnica de fluorescência (DAPI) onde nas setas vermelhas são evidenciados: Vesícula germinativa (A), Quebra de vesícula germinativa (B), Metáfase I (C) e Degenerado (D). Jaboticabal-SP, 2012.

Tabela 9 – Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados no M0 e após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados em cada meio de maturação, sendo CON (controle), IGF, EGF e M0. Jaboticabal-SP, 2012.

Parâmetros Avaliados	Frequência absoluta e relativa (%)			
	CON	IGF	EGF	M0
Total	62 (100)	65 (100)	74 (100)	86 (100)
VG	4 (6,45) ^a	7 (10,77) ^a	11 (14,86) ^a	12 (13,95) ^a
QVG	9 (14,52) ^a	6 (9,23) ^a	5 (6,76) ^a	8 (9,30) ^a
MI	4 (6,45) ^a	2 (3,08) ^a	1 (1,35) ^a	2 (2,33) ^a
MII	-	-	-	-
Degenerados	45 (72,58) ^a	50 (76,92) ^a	57 (77,03) ^a	64 (74,33) ^a

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

Tabela 10 – Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados no M0 e após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados em cada meio de maturação, sendo CON (controle), IGF, EGF e M0. Jaboticabal-SP, 2012.

Parâmetros Avaliados	Frequência absoluta e relativa (%)			
	CON	IGF	EGF	M0
Total	77 (100)	72 (100)	88 (100)	90 (100)
VG	3 (3,90) ^a	1 (1,39) ^a	2 (2,27) ^a	5 (5,55) ^a
QVG	19 (24,66) ^a	17 (23,61) ^a	27 (30,68) ^a	33 (36,67) ^a
MI	7 (9,09) ^a	3 (4,17) ^a	9 (10,23) ^a	4 (4,44) ^a
MII	-	-	-	-
Degenerados	48 (62,35) ^a	51 (70,83) ^a	50 (56,82) ^a	48 (53,33) ^a

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

Quando as duas colorações foram comparadas por grupo, encontrou-se uma maior quantidade de oócitos em QVG, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), nos grupos IGF e EGF na coloração HOESTCH (Tabelas 11 e 12). Também no grupo EGF, foi observado na coloração HOESTCH menor taxa de oócitos degenerados e em VG e maior índice de oócitos em MI (Tabela 12), todos com diferenças significativas ($p < 0,05$). O grupo M0 também mostrou maior taxa de QVG e menor quantidade oócitos degenerados ($p < 0,05$) na coloração HOESTCH (Tabela 13).

Tabela 11 – Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados (DEG) do grupo controle (CON). Jaboticabal-SP, 2012.

	CON DAPI (%)	CON HOESTCH (%)
VG	4 (6,45) ^a	3 (3,9) ^a
QVG	9 (14,52) ^a	19 (24,66) ^a
MI	4 (6,45) ^a	7 (9,09) ^a
MII	0	0
DEG	45 (72,58) ^a	48 (62,35) ^a
TOTAL	62 (100)	77 (100)

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

Tabela 12 – Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados do grupo IGF. Jaboticabal-SP, 2012

	IGF DAPI (%)	IGF HOESTCH (%)
VG	7 (10,77) ^a	1 (1,39) ^b
QVG	6 (9,23) ^a	17 (23,61) ^b
MI	2 (3,08) ^a	3 (4,17) ^a
MII	0	0
DEG	50 (76,92) ^a	51 (70,83) ^a
TOTAL	65 (100)	77 (100)

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

Tabela 13 – Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados após 96 horas de cultivo, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados do grupo EGF. Jaboticabal-SP, 2012.

	EGF DAPI (%)	EGF HOESTCH (%)
VG	11 (14,86) ^a	2 (2,27) ^b
QVG	5 (6,76) ^a	27 (30,68) ^b
MI	1 (1,35) ^a	9 (10,23) ^b
MII	0	0
DEG	57 (77,03) ^a	50 (56,82) ^b
TOTAL	74 (100)	88 (100)

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

Tabela 14 – Frequência absoluta e relativa (%) dos COCs grau I, avaliados no M0, por meio de coloração nuclear (DAPI e HOESTCH), de cadelas em diferentes fases do ciclo estral, nos estágios de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I e II (MI e MII) e degenerados do grupo M0. Jaboticabal-SP, 2012.

	M0 DAPI (%)	M0 HOESTCH (%)
VG	12 (13,95) ^a	5 (5,55) ^a
QVG	8 (9,39) ^a	33 (36,67) ^b
MI	2 (2,33) ^a	4 (4,44) ^a
MII	0	0
DEG	64 (74,33) ^a	48 (53,33) ^b
TOTAL	86 (100)	90 (100)

Letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

6.2. IMUNO-HISTOQUIMICA

6.2.1. EGF

Foi encontrada marcação citoplasmática positiva para o EGF nas células foliculares (CF) de folículos secundários e terciários, no citoplasma de oócitos de folículos secundários e terciários, na parede vascular, nos cordões de células da granulosa (CCG) e nas células luteínicas (CL) (Tabela 15).

Tabela 15- Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-EGF, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.

Estruturas ovarianas	Amostras positivas (%)	Intensidade de coloração (%)	Porcentagem de células coradas 1-5 (%)
CF folículos secundários	45%	leve (32%)	2 (22%)
CF folículos terciários	35%	leve (19%)	2 (14%)
Oócitos em fol. secundários	81%	leve (35%)	5 (81%)
Oócitos em fol. terciários	54%	leve (27%)	5 (49%)
Parede vascular	89%	leve (44%)	3 (38%)
CCG	75%	leve (43%)	2 (40%)
Células Luteínicas	58%	leve (58%)	2 (47%)

CF: Células foliculares; CCG: Cordões de células da granulosa

O epitélio superficial, os túbulos corticais, estroma ovariano, folículos primordiais e primários não apresentaram marcação positiva para o EGF.

As figuras 8 e 9 demonstram as comparações entre as estruturas ovarianas avaliadas quanto à intensidade de coloração e porcentagem de células coradas, respectivamente.

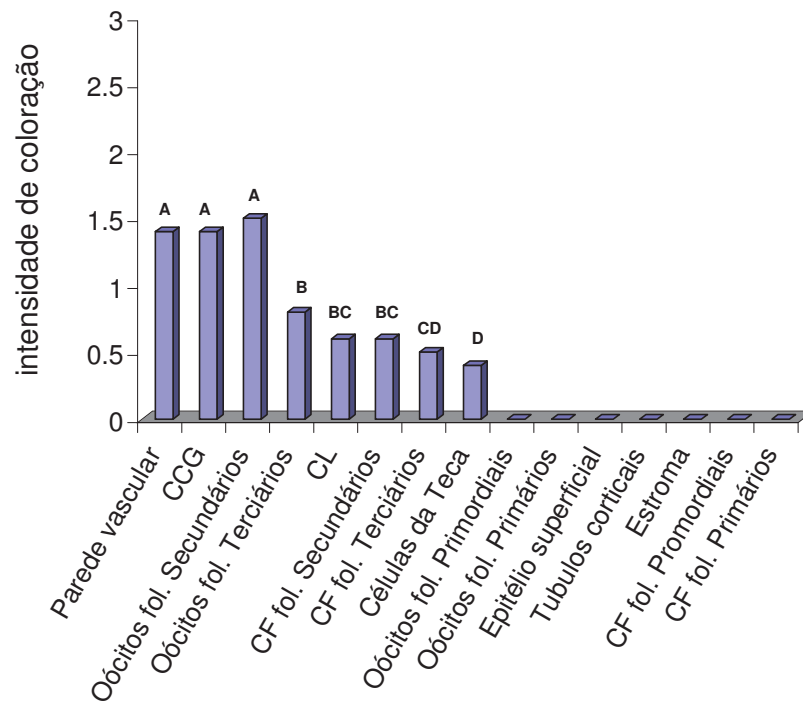


Figura 8 – Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-EGF. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

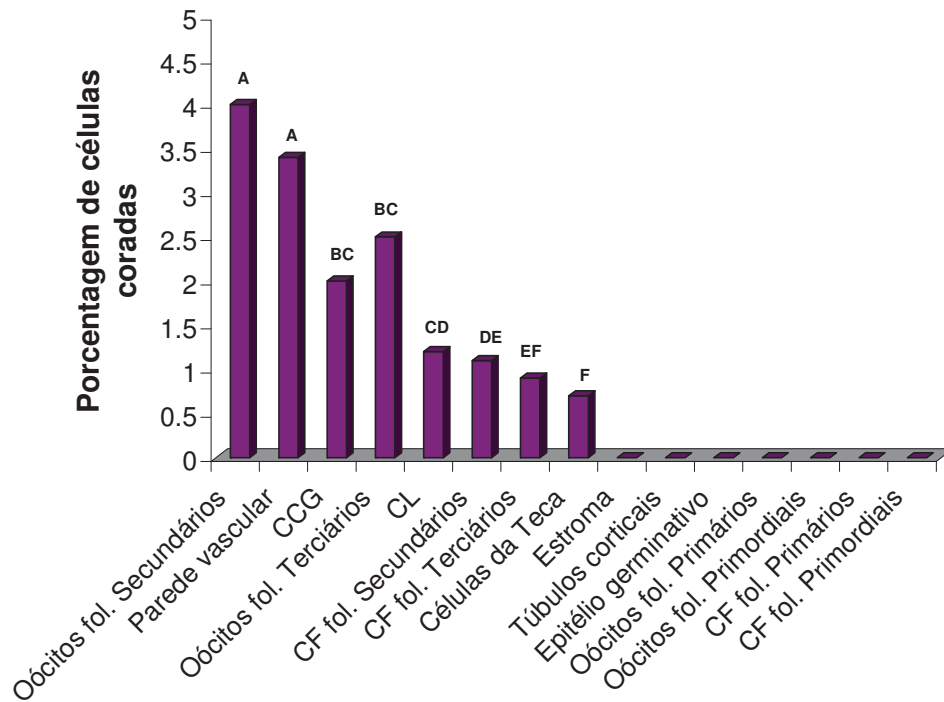


Figura 9 – Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-EGF. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

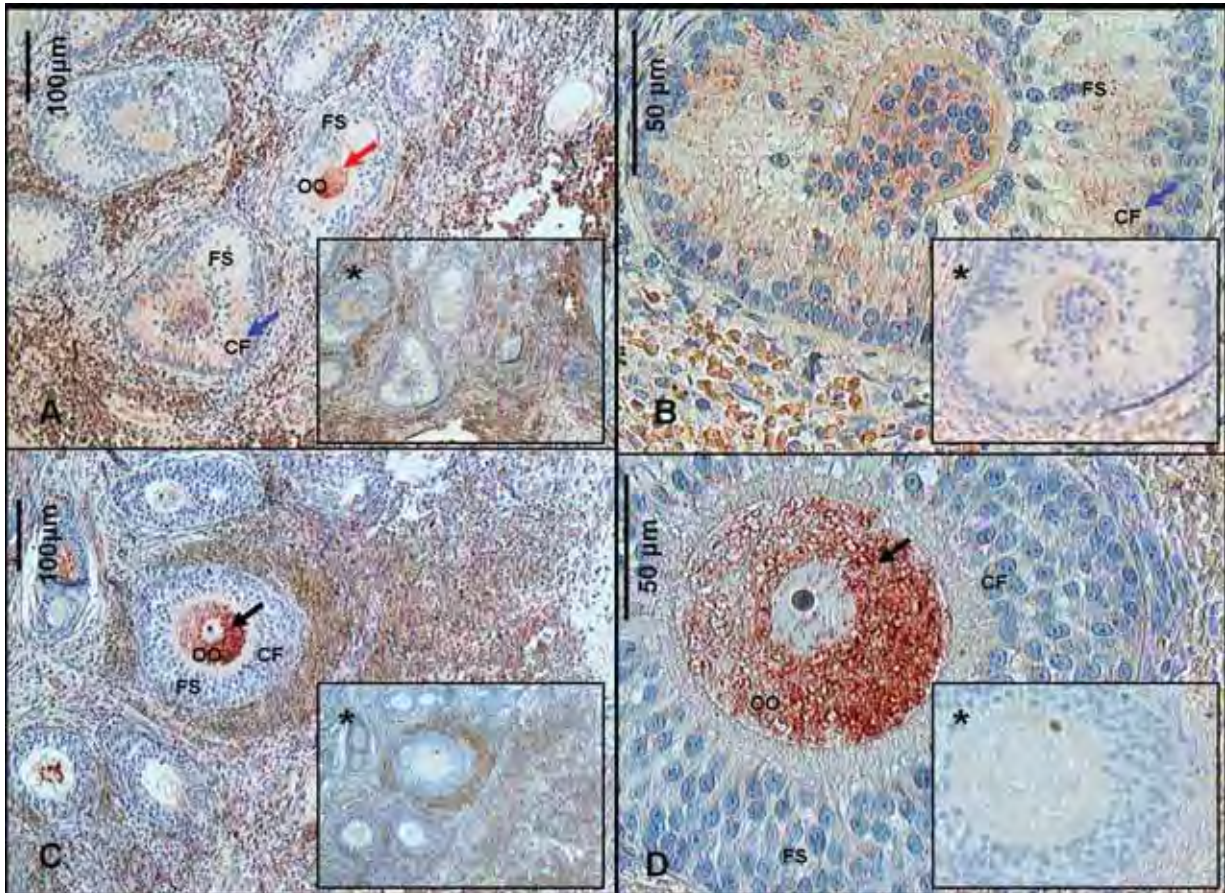


Figura 10 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células foliculares de folículos secundários (A,B) e citoplasma de oócito de folículo secundário (A,C,D). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FS (Folículo secundário); CF (Células foliculares); OO (Oócito). Jaboticabal-SP, 2012.

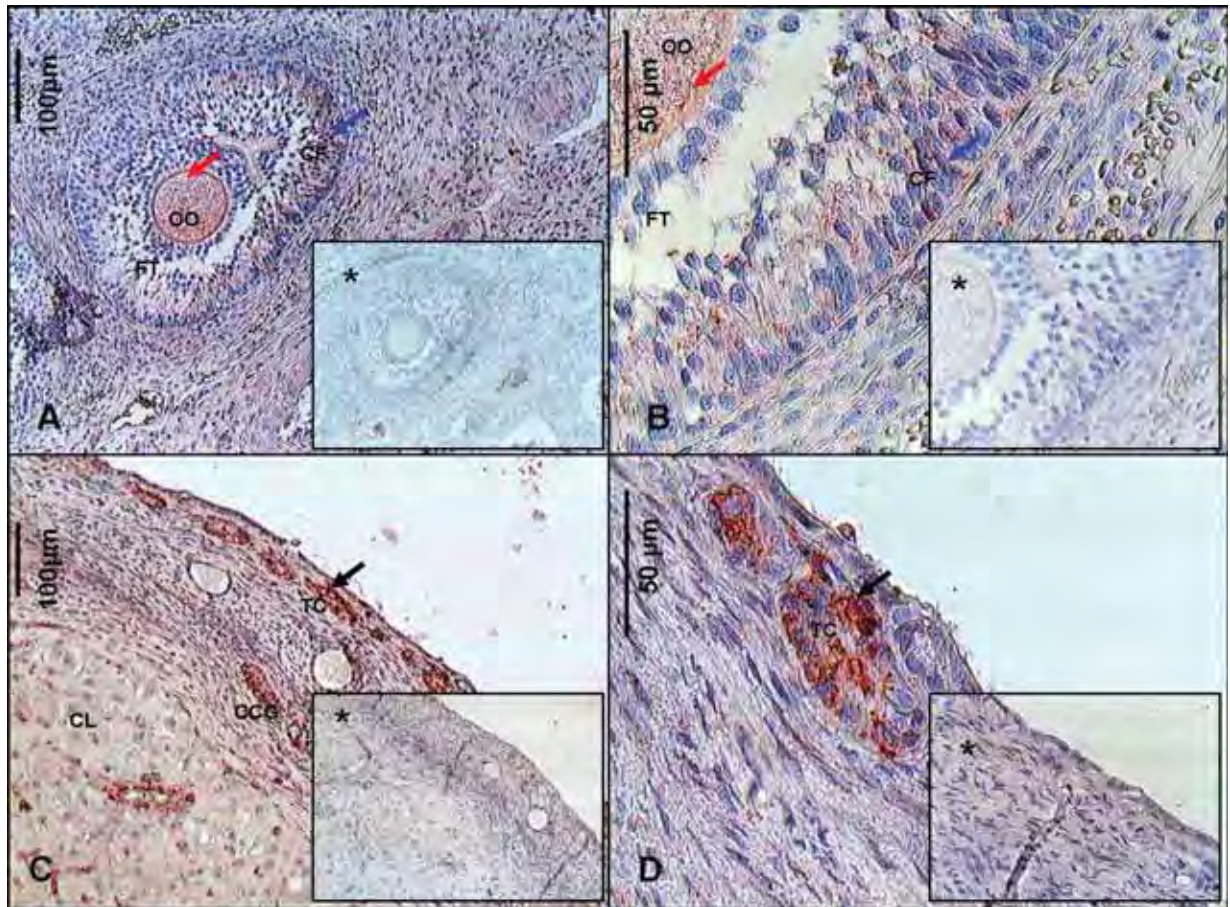


Figura 11 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células foliculares de folículos terciários (A,B) e nos túbulos corticais (C,D). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FT (Folículo terciário); CF (Células foliculares); OO (Oócito); CL (Células luteínicas); CCG (Cordões de células da granulosa); TC (Túbulos corticais). Jaboticabal-SP, 2012.

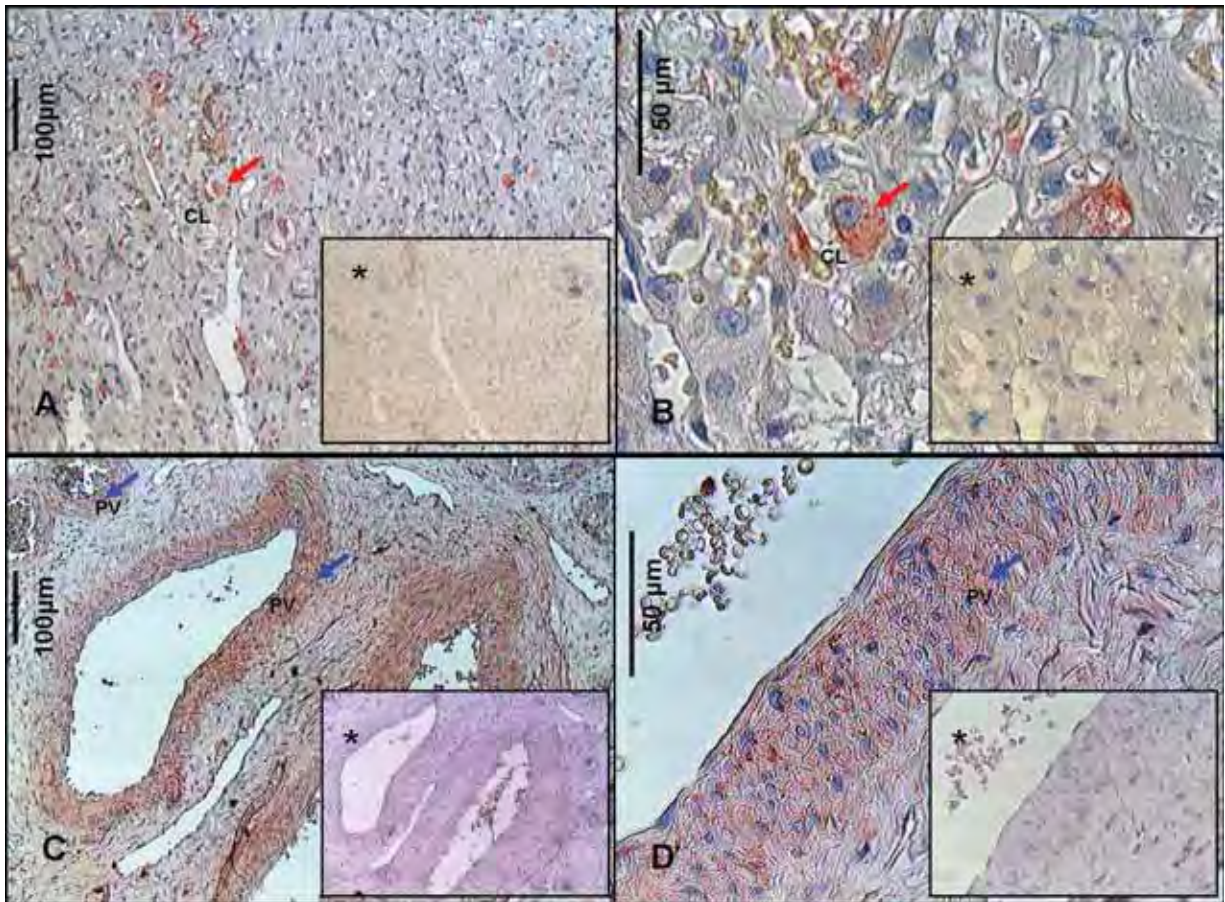


Figura 12 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células luteínicas (A,B) e na parede vascular (C,D). Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. CL (Células luteínicas); PV (Parede vascular) Jaboticabal-SP, 2012.

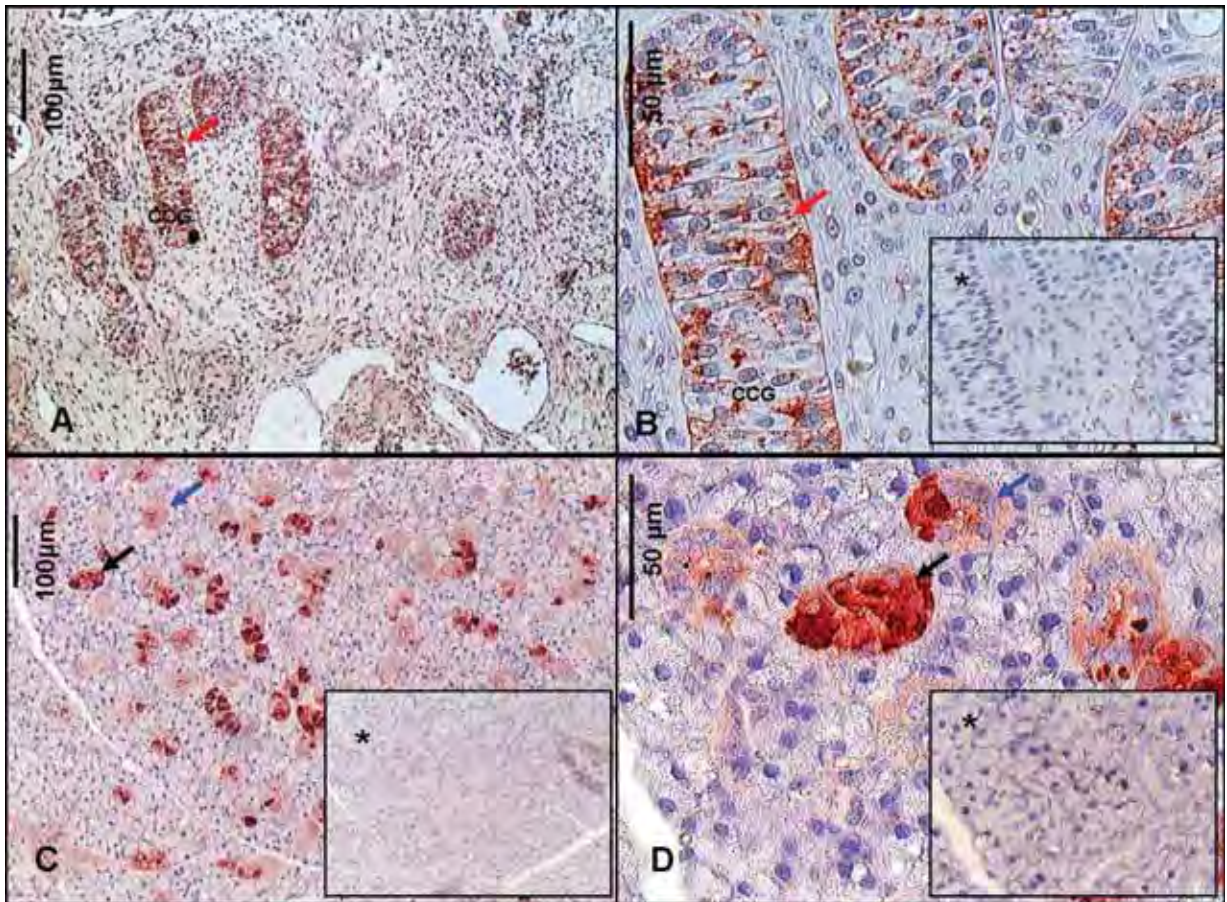


Figura 13 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas (A,B) e glândula salivar de rato (C,D), demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento epidermal (EGF) nos cordões de células da granulosa (A,B) de ovários de cadelas e na glândula salivar de rato (C,D), utilizada como controle positivo. Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. CCG (Cordões de células da granulosa). Jaboticabal-SP, 2012.

6.2.2. EGF-R

Para o receptor do EGF foi encontrada marcação nuclear positiva no epitélio superficial, estroma ovariano, túbulos corticais, parede vascular, CL, CF de folículos primários, secundários e terciários e nas células da teca (Tabela 16).

Tabela 16- Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-EGF-R, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.

Estruturas ovarianas	Amostras positivas (%)	Intensidade de coloração (%)	Porcentagem de células coradas 1-5 (%)
Epitélio superficial	67%	leve (56%)	3 (33%)
Estroma ovariano	94%	leve (92%)	2 (48%)
Túbulos corticais	95%	leve (85%)	3 (42%)
CF folículos primários	89%	leve (80%)	2 (31%)
CF folículos secundários	90%	leve (70%)	5 (34%)
CF folículos terciários	83%	leve (80%)	5 (31%)
Células da Teca	89%	leve (69%)	3 (25%)
Parede vascular	95%	leve (83%)	4 (31%)
CCG	91%	leve (86%)	3 (53%)
Células Luteínicas	70%	leve (70%)	2 (30%)

CF: Células foliculares; CCG: Cordões de células da granulosa

CF de folículos primordiais e oócitos não apresentaram marcação positiva para o EGF-R.

As figuras 14 e 15 demonstram as comparações entre as estruturas ovarianas avaliadas quanto à intensidade de coloração e porcentagem de células coradas, respectivamente.

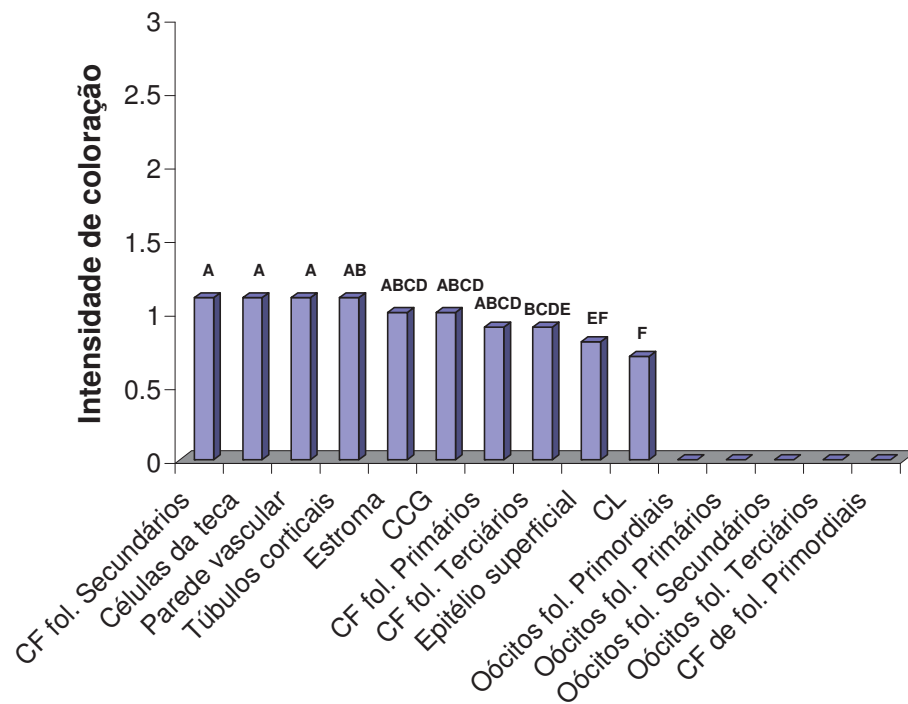


Figura 14 – Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-EGF-R. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

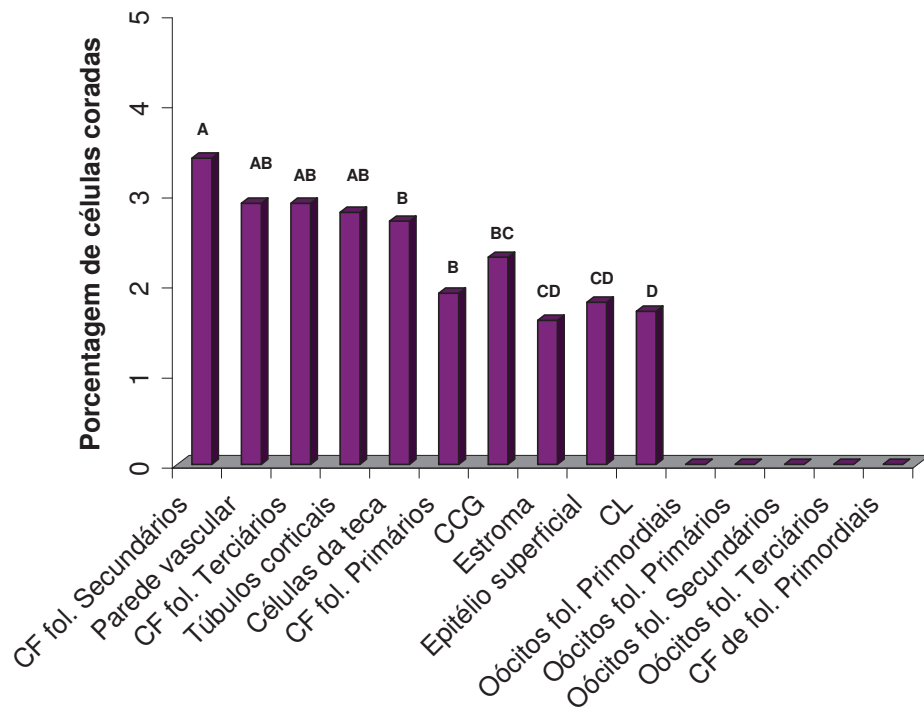


Figura 15 – Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-EGF-R. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

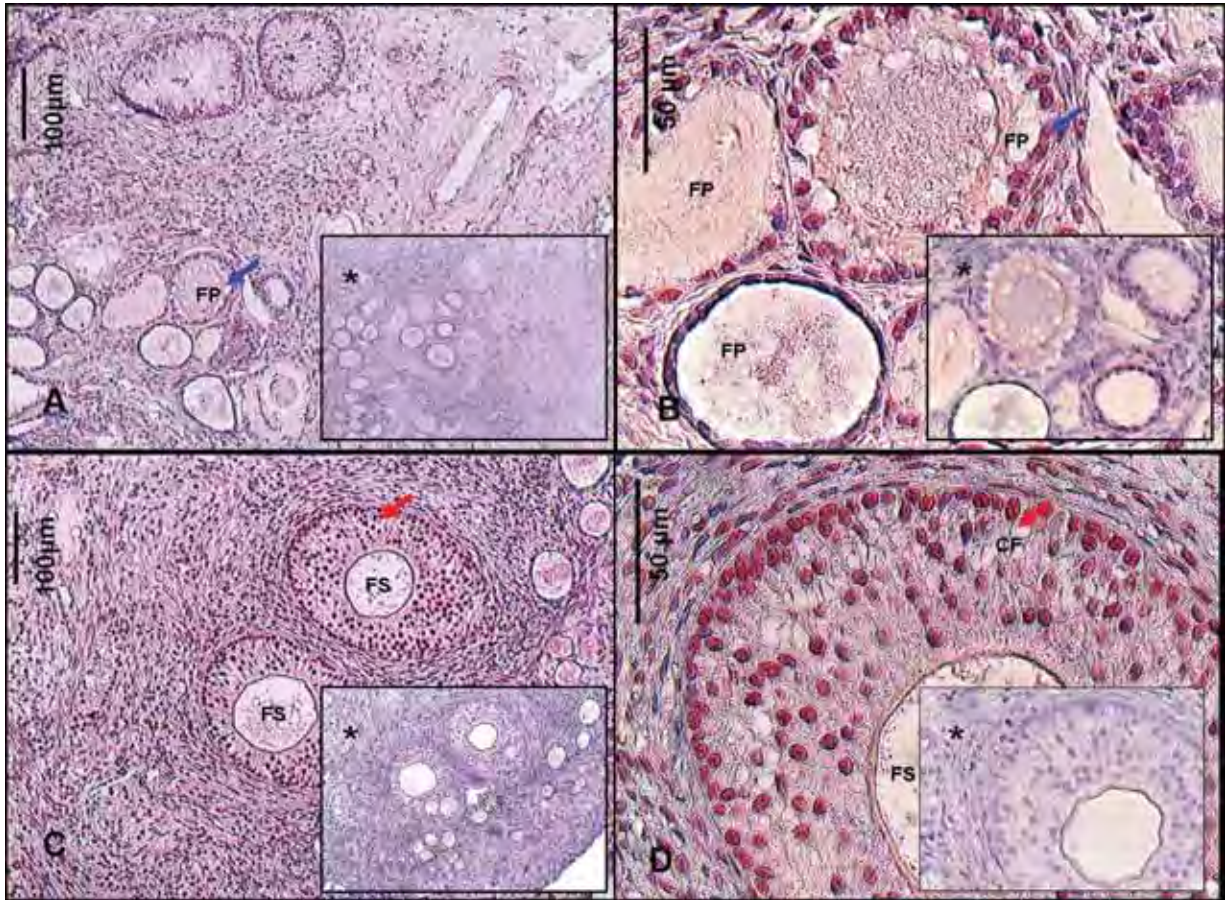


Figura 16 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) nas células foliculares de folículos primários (A,B) e secundários (C,D). Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FP (Folículo primário); FS (Folículo secundário); CF (Células foliculares). Jaboticabal-SP, 2012.

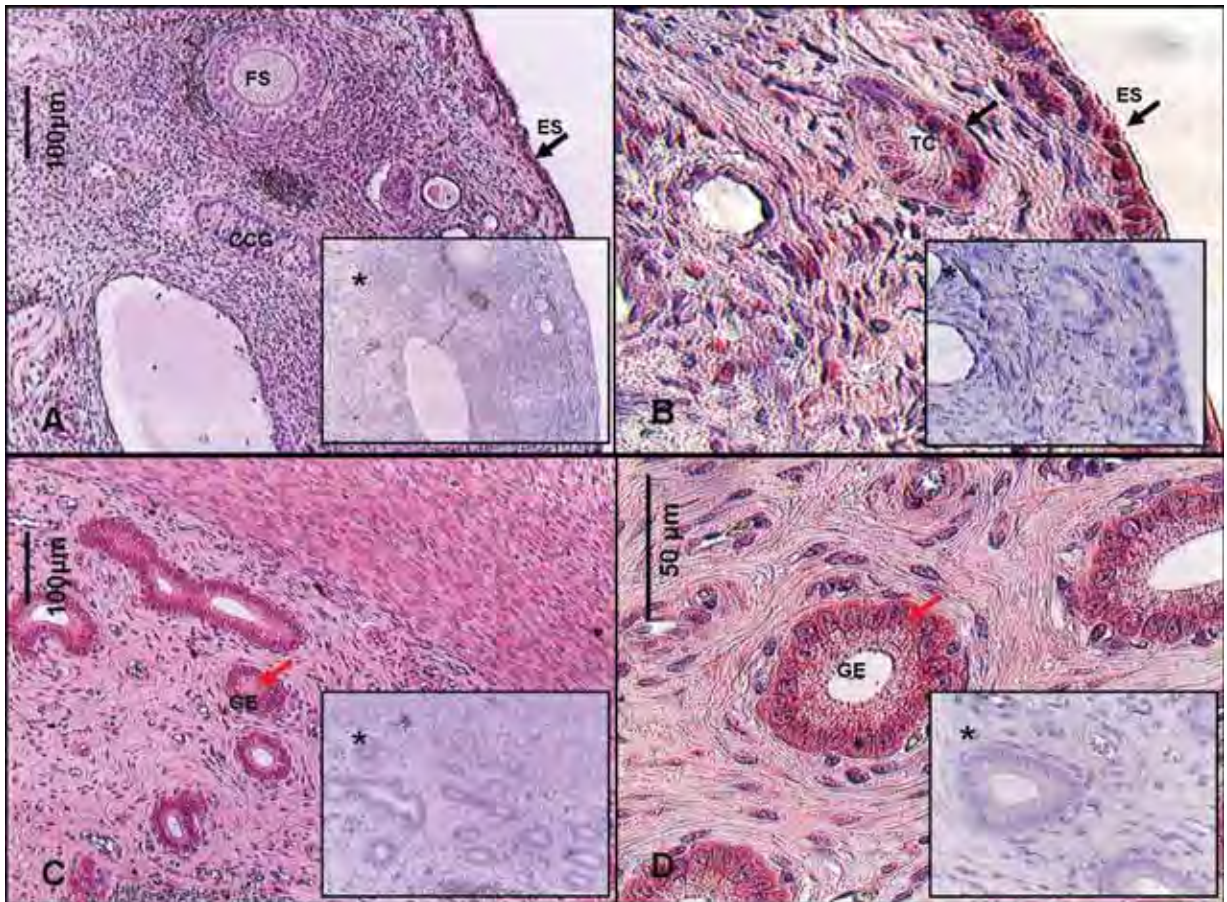


Figura 17 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário de cadela (A,B) e útero de cadela (C,D), demonstrando a imunolocalização do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) nos túbulos corticais (B) e epitélio superficial (A,B) de ovários de cadelas, e no útero e cadelas (C,D), utilizado como controle positivo. Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FS (Folículo secundário); CCG (Cordões de células da granulosa); ES (Epitélio superficial); TC (Túbulos corticais); GE (Glândulas endometriais). Jaboticabal-SP, 2012.

6.2.3. TGF-ALFA

Foi observada marcação citoplasmática positiva para o TGF-ALFA no epitélio superficial, estroma ovariano, túbulos corticais, parede vascular, CL, CF de folículos primários, secundários e terciários, células da teca e nos oócitos de folículos primordiais, primários, secundários e terciários (Tabela 17).

Tabela 17- Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-TGF-ALFA, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.

Estruturas ovarianas	Amostras positivas (%)	Intensidade de coloração (%)	Porcentagem de células coradas 1-5 (%)
Epitélio superficial	89%	forte (54%)	5 (78%)
Estroma ovariano	95%	leve (51%)	3 (45%)
Túbulos corticais	100%	forte (60%)	5 (89%)
CF folículos primários	100%	forte (42%)	5 (94%)
CF folículos secundários	100%	forte (64%)	5 (97%)
CF folículos terciários	100%	forte (55%)	5 (90%)
Oócitos em fol. primordiais	92%	forte (36%)	5 (92%)
Oócitos em fol. primários	81%	leve (39%)	5 (81%)
Oócitos em fol. secundários	100%	leve (33%)	5 (100%)
Oócitos em fol. terciários	100%	leve (29%)	5 (100%)
Células da Teca	100%	forte (55%)	5 (90%)
Parede vascular	100%	leve (62%)	5 (43%)
CCG	100%	moderada (55%)	5 (94%)
Células Luteínicas	100%	forte (84%)	5 (95%)

CF: Células foliculares; CCG: Cordões de células da granulosa

As CF de folículos primordiais não apresentaram marcação positiva para o TGF-ALFA.

As figuras 18 e 19 demonstram as comparações entre as estruturas ovarianas avaliadas quanto à intensidade de coloração e porcentagem de células coradas, respectivamente.

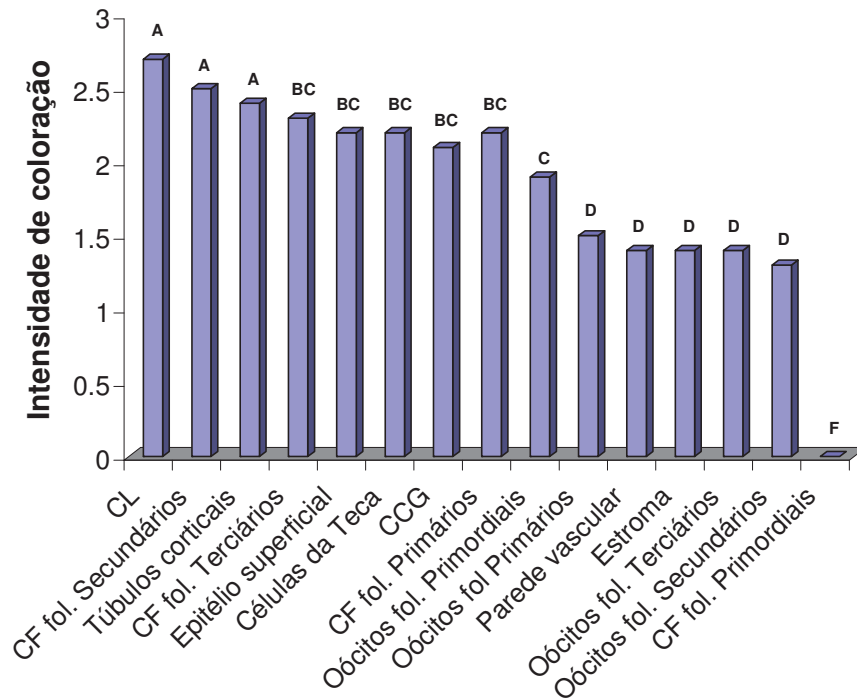


Figura 18 – Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-TGF-ALFA. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

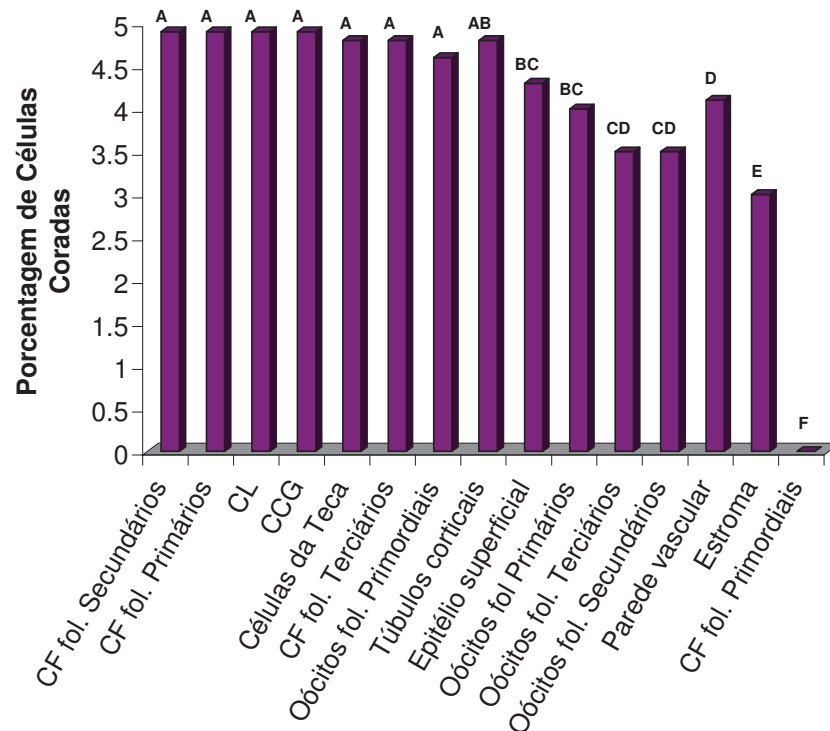


Figura 19 – Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para o anticorpo anti-TGF-ALFA. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

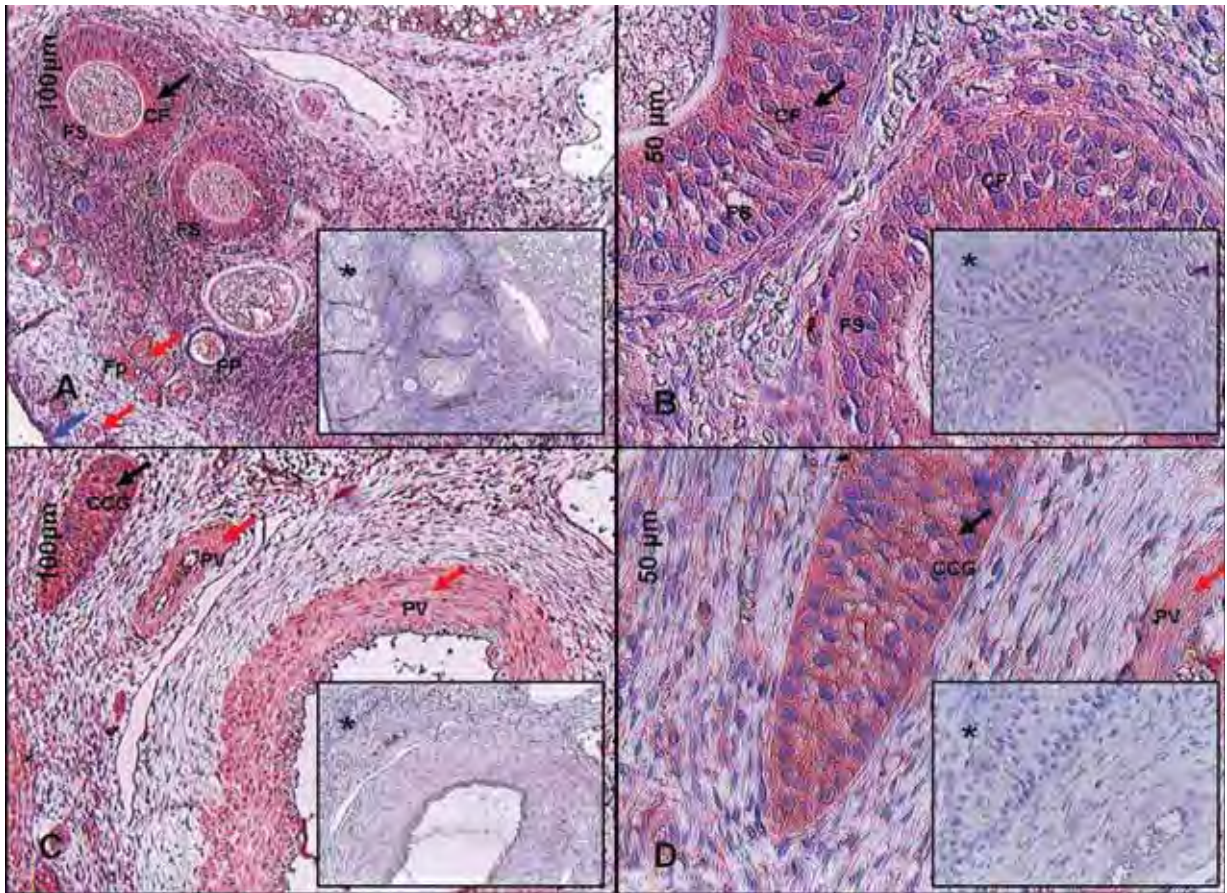


Figura 20 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do *Transforming growth factor alfa* (TGF-ALFA) nas células foliculares de folículos secundários (A,B), citoplasmas de oócitos em folículos primordiais (A), túbulos corticais (A), células luteínicas e epitélio superficial (A), cordões de células da granulosa e parede vascular (C,D). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículo primordial); FP (Folículo primário); FS (Folículo secundário); CCG (Cordões de células da granulosa); PV (Parede vascular). Jaboticabal-SP, 2012.

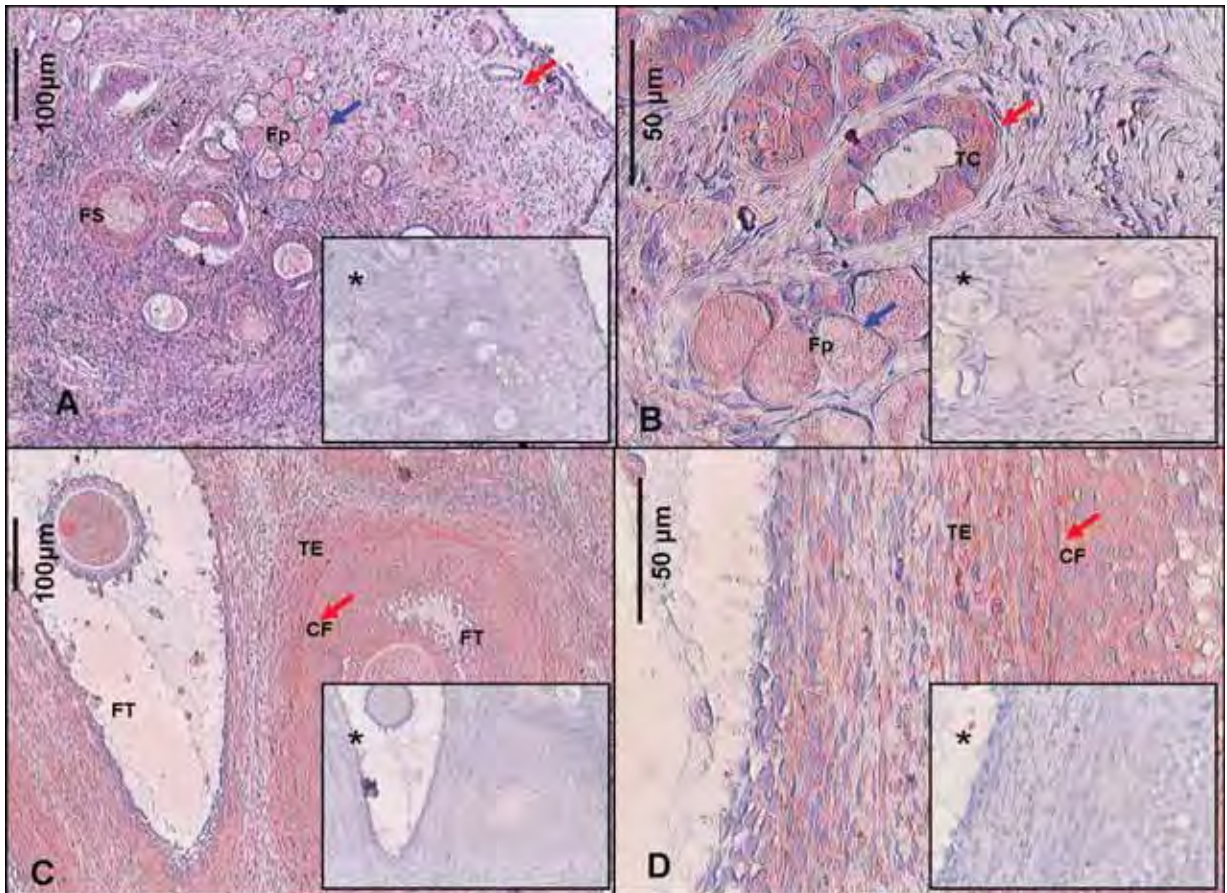


Figura 21 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do *Transforming growth factor alfa* (TGF-ALFA) nos oócitos de folículos primordiais e túbulos corticais (A,B), citoplasmas de oócitos e células foliculares de folículos terciários (C,D). Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículo primordial); FS (Folículo secundário); FT (Folículo terciário); CF (Células foliculares); TE (Teca); TC (Túbulos corticais). Jaboticabal-SP, 2012.

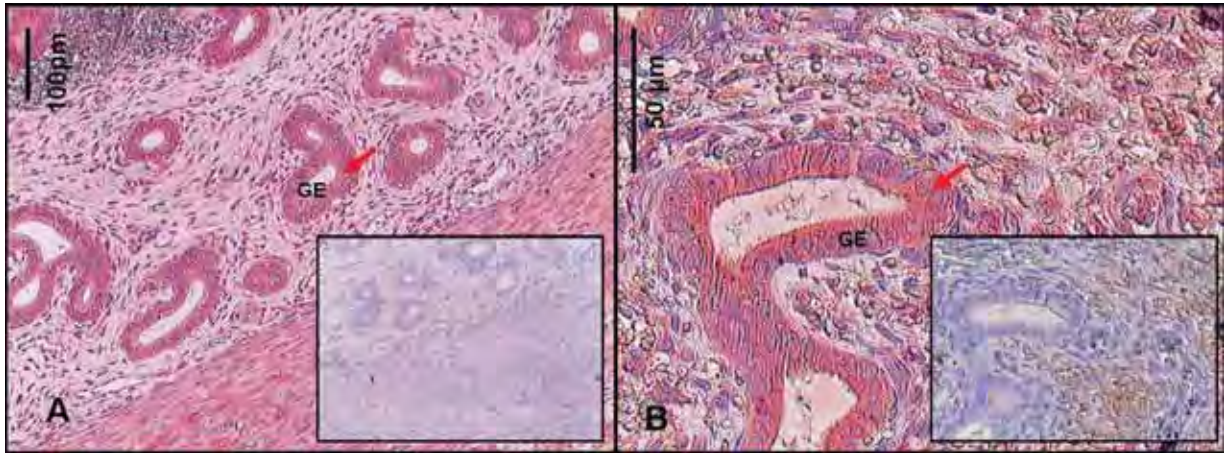


Figura 22 – Fotomicrografia de cortes histológicos de útero de cadela, demonstrando a imunolocalização do *Transforming growth factor alfa* (TGF-ALFA), utilizado como controle positivo. Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada. A imagem foi obtida na objetiva de 10x. A imagem B foi obtida na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. GE (Glândulas endometriais). Jaboticabal-SP, 2012.

6.2.4. IGF-1

Foi observada marcação nuclear positiva para o IGF-1 no epitélio superficial, estroma ovariano, túbulos corticais, CL, CF de folículos primários, secundários e terciários, células da teca e nos oócitos de folículos primordiais, primários e secundários, já a parede vascular apresentou marcação citoplasmática (Tabela 18).

Tabela 18- Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-IGF-1, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.

Estruturas ovarianas	Amostras positivas (%)	Intensidade de coloração (%)	Porcentagem de células coradas 1-5 (%)
Epitélio superficial	57%	moderada (30%)	4 (22%)
Estroma ovariano	87%	leve (65%)	2 (46%)
Túbulos corticais	84%	moderada (41%)	5 (35%)
CF folículos primários	68%	leve (40%)	2 (94%)
CF folículos secundários	88%	forte (34%)	5 (97%)
CF folículos terciários	62%	moderada (30%)	3 (25%)
Oócitos em fol. primordiais	73%	leve (62%)	5 (73%)
Oócitos em fol. primários	68%	leve (35%)	5 (68%)
Oócitos em fol. secundários	62%	leve (46%)	5 (62%)
Células da Teca	86%	leve (42%)	4 (31%)
Parede vascular	100%	forte (41%)	5 (70%)
CCG	75%	moderada (41%)	4 (30%)
Células Luteínicas	74%	moderada (43%)	4 (29%)

CF: Células foliculares; CCG: Cordões de células da granulosa

As CF de folículos primordiais e os oócitos de folículos terciários não apresentaram marcação positiva para o IGF-1.

As figuras 23 e 24 demonstram as comparações entre as estruturas ovarianas avaliadas quanto à intensidade de coloração e porcentagem de células coradas, respectivamente.

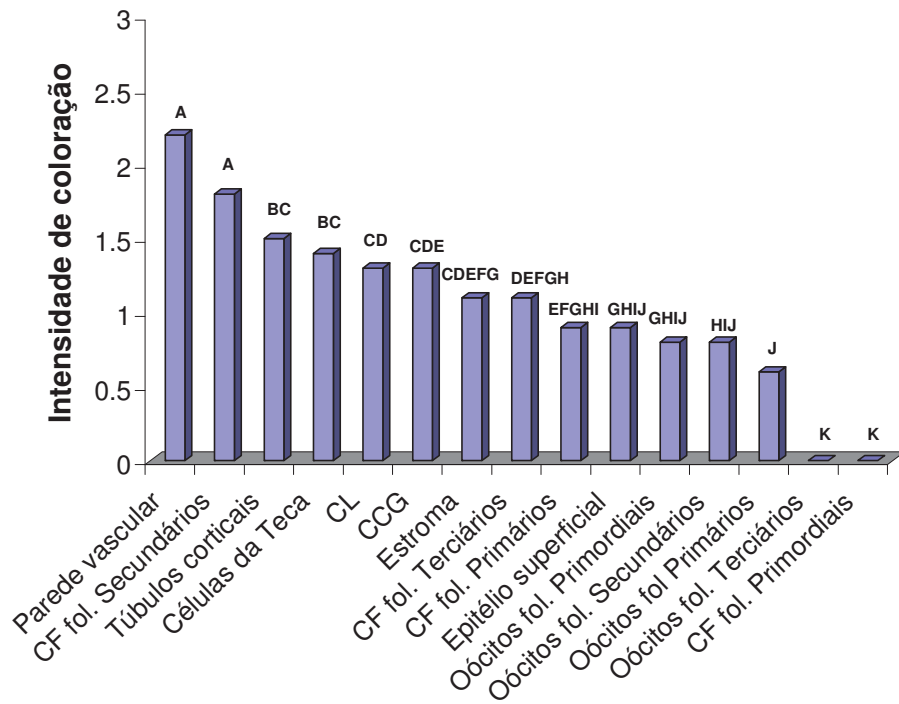


Figura 23 – Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-IGF-1. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

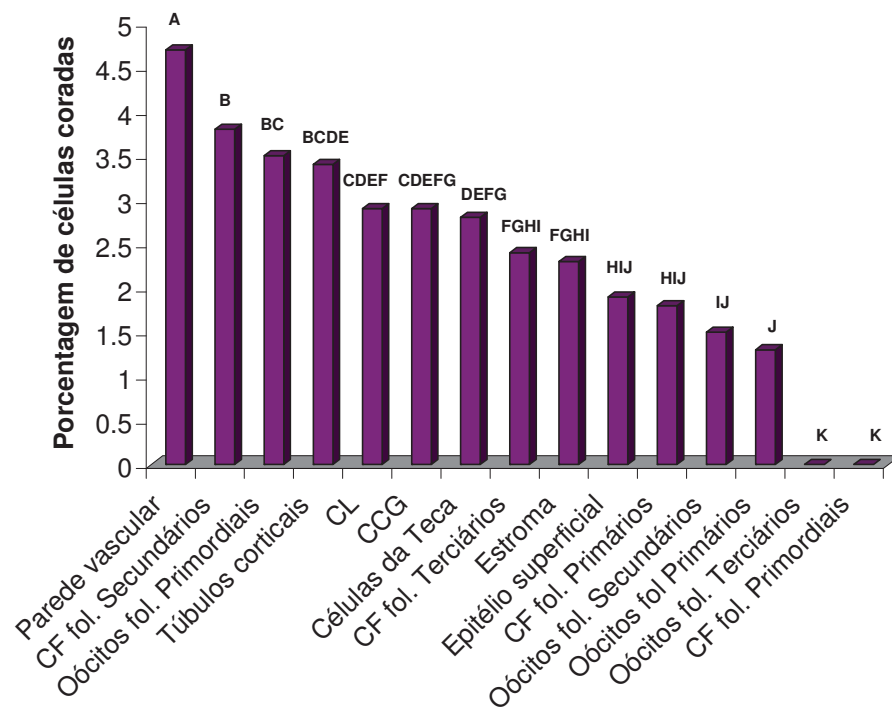


Figura 24 – Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-IGF-1. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

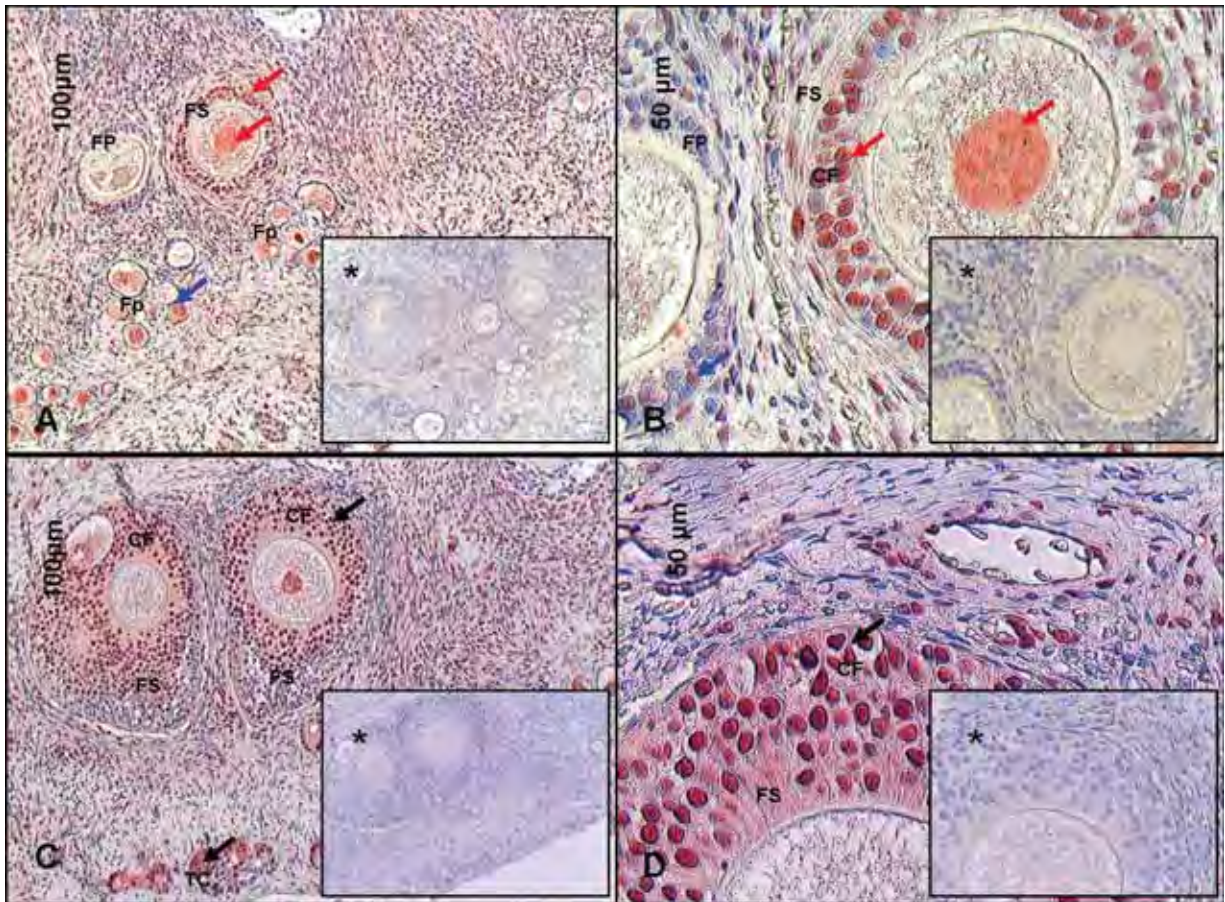


Figura 25 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) nas células foliculares de folículos primários (A,B) e secundários (A,B,C,D), em oócitos de folículos primordiais (A), primários (A) e secundários (A,B,C) e nos túbulos corticais (C). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículo primordial); FP (Folículo primário); FS (Folículo secundário); CF (Células foliculares); TC (Túbulos corticais). Jaboticabal-SP, 2012.

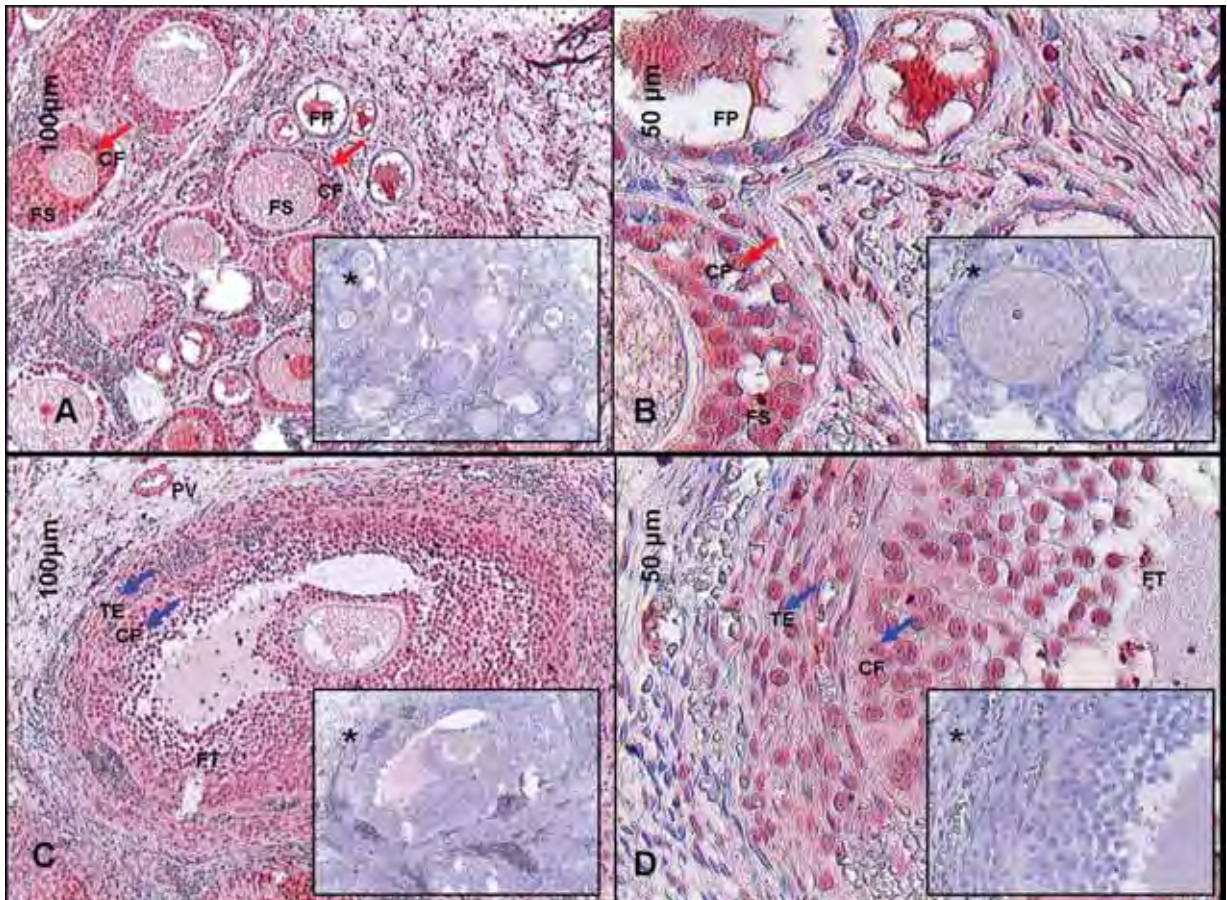


Figura 26 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) nas células foliculares de folículos primários, secundários (A,B) e terciários (C,D) e nas células da teca (C,D). Setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículo primordial); FP (Folículo primário); FS (Folículo secundário); CF (Células foliculares); TE (Células da teca). Jaboticabal-SP, 2012.

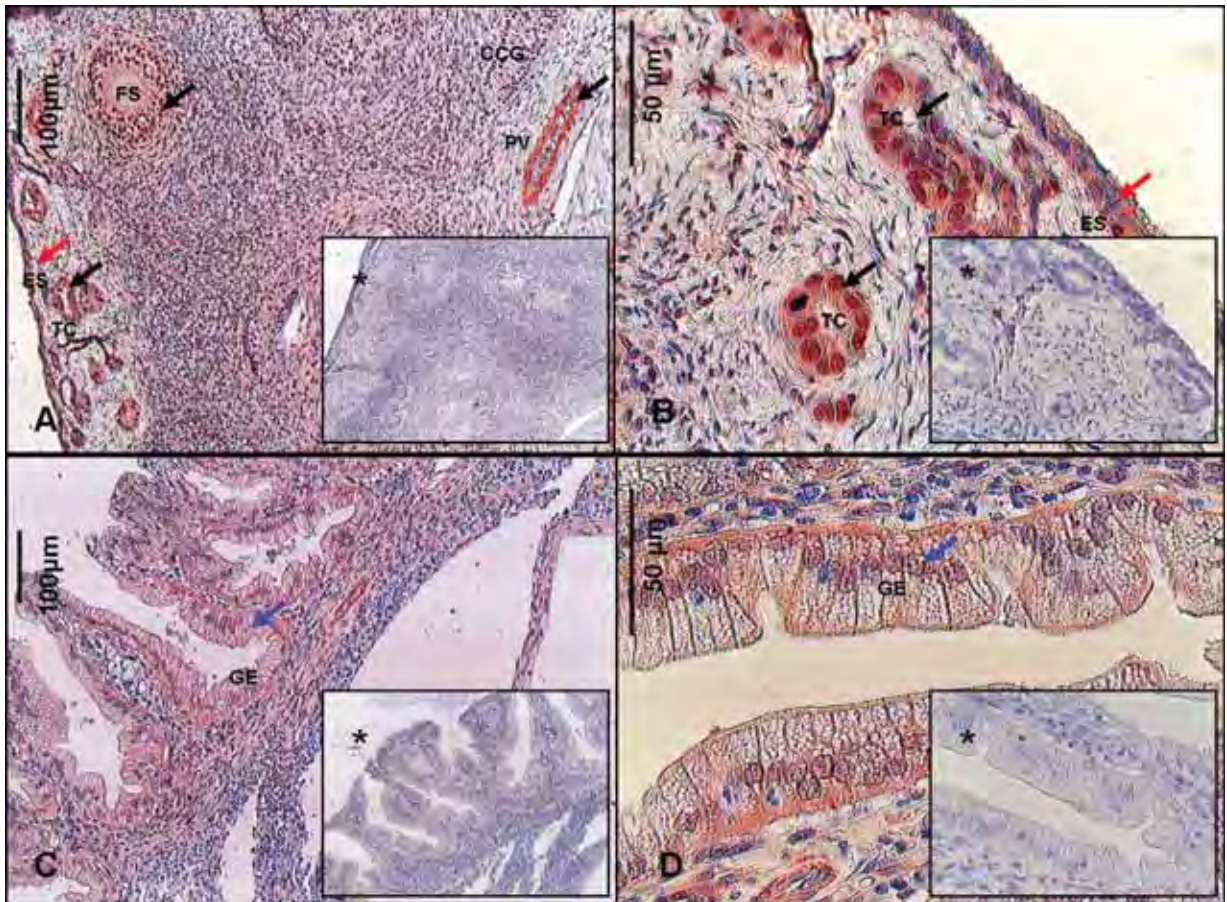


Figura 27 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário de cadela (A,B) e útero de cadela (C,D), demonstrando a imunolocalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) nas células foliculares de folículos secundários (A), túbulos corticais (A,B), epitélio superficial (A,B) e parede vascular (A) de ovários de cadelas, e também no útero de cadelas com hiperplasia endometrial cística (C,D), utilizado como controle positivo. Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada e setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FS (Folículos secundários); TC (Túbulos corticais); ES (Epitélio superficial); GE (Glândulas endometriais). Jaboticabal-SP, 2012.

6.2.5. IGF-1R

Apresentaram marcação citoplasmática positiva para o IGF-R o epitélio superficial, estroma ovariano, túbulos corticais, parede vascular, CL, CF de folículos primários, secundários e terciários, células da teca e os oócitos de folículos primordiais, primários, secundários e terciários (Tabela 19).

Tabela 19- Porcentagem de amostras positivas, intensidade de coloração predominante e escore para porcentagem de células coradas predominante, para cada estrutura ovariana positiva para o anticorpo anti-IGF-1R, em ovários de cadelas. Jaboticabal-SP, 2012.

Estruturas ovarianas	Amostras positivas (%)	Intensidade de coloração (%)	Porcentagem de células coradas 1-5 (%)
Epitélio superficial	84%	leve (43%)	2 (43%)
Estroma ovariano	87%	leve (78%)	2 (62%)
Túbulos corticais	100%	moderada (52%)	3 (42%)
CF folículos primários	97%	leve (71%)	2 (69%)
CF folículos secundários	100%	moderada (56%)	3 (38%)
CF folículos terciários	91%	moderada (56%)	3 (47%)
Oócitos em fol. primordiais	90%	forte (61%)	5 (90%)
Oócitos em fol. primários	90%	forte (60%)	5 (90%)
Oócitos em fol. secundários	90%	forte (62%)	5 (90%)
Oócitos em fol. terciários	90%	forte (58%)	5 (90%)
Células da Teca	77%	leve (62%)	2 (59%)
Parede vascular	100%	leve (45%)	3 (37%)
CCG	92%	leve (45%)	3 (43%)
Células Luteínicas	79%	leve (43%)	2 (29%)

CF: Células foliculares; CCG: Cordões de células da granulosa

As CF de folículos primordiais não apresentaram marcação positiva para o IGF-1-R.

As figuras 28 e 29 demonstram as comparações entre as estruturas ovarianas avaliadas quanto à intensidade de coloração e porcentagem de células coradas, respectivamente.

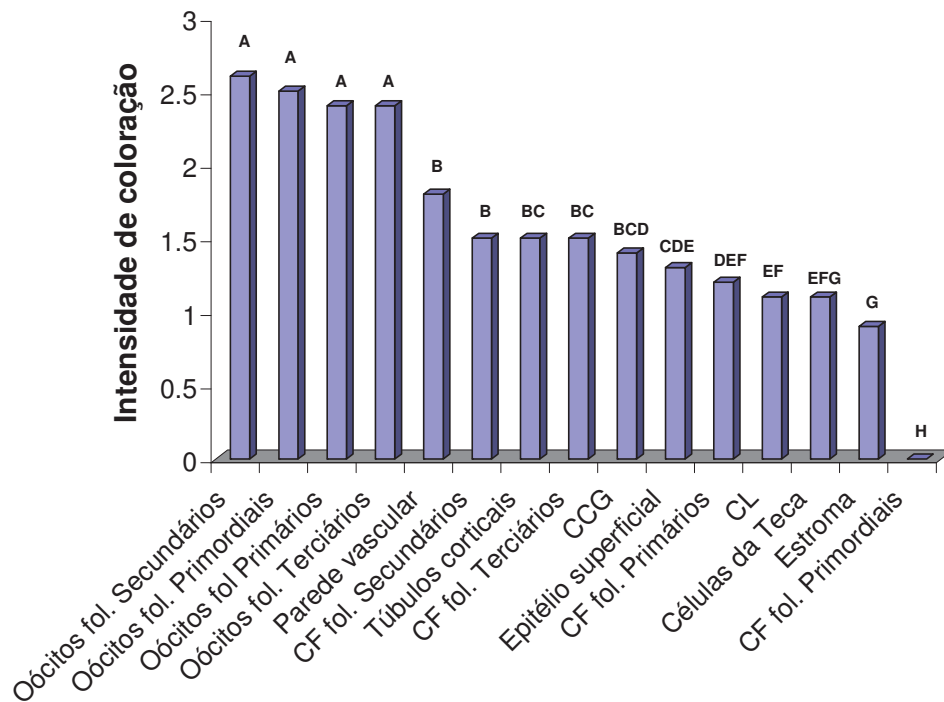


Figura 28 – Comparação da intensidade de coloração entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-IGF-1R. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

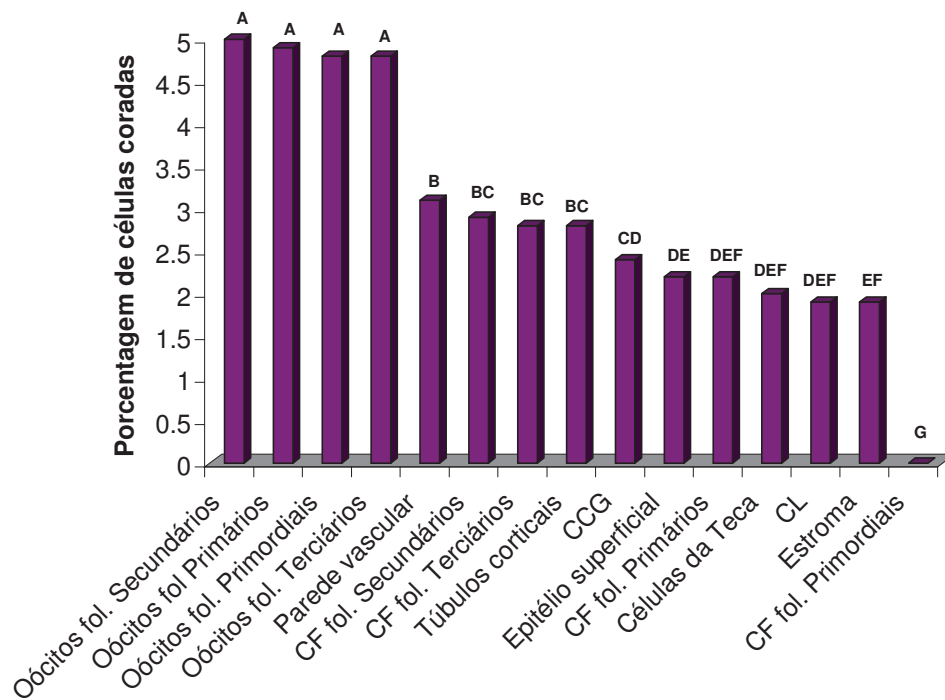


Figura 29 – Comparação da porcentagem de células coradas entre as estruturas ovarianas de cadelas, avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para o anticorpo anti-IGF-1R. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

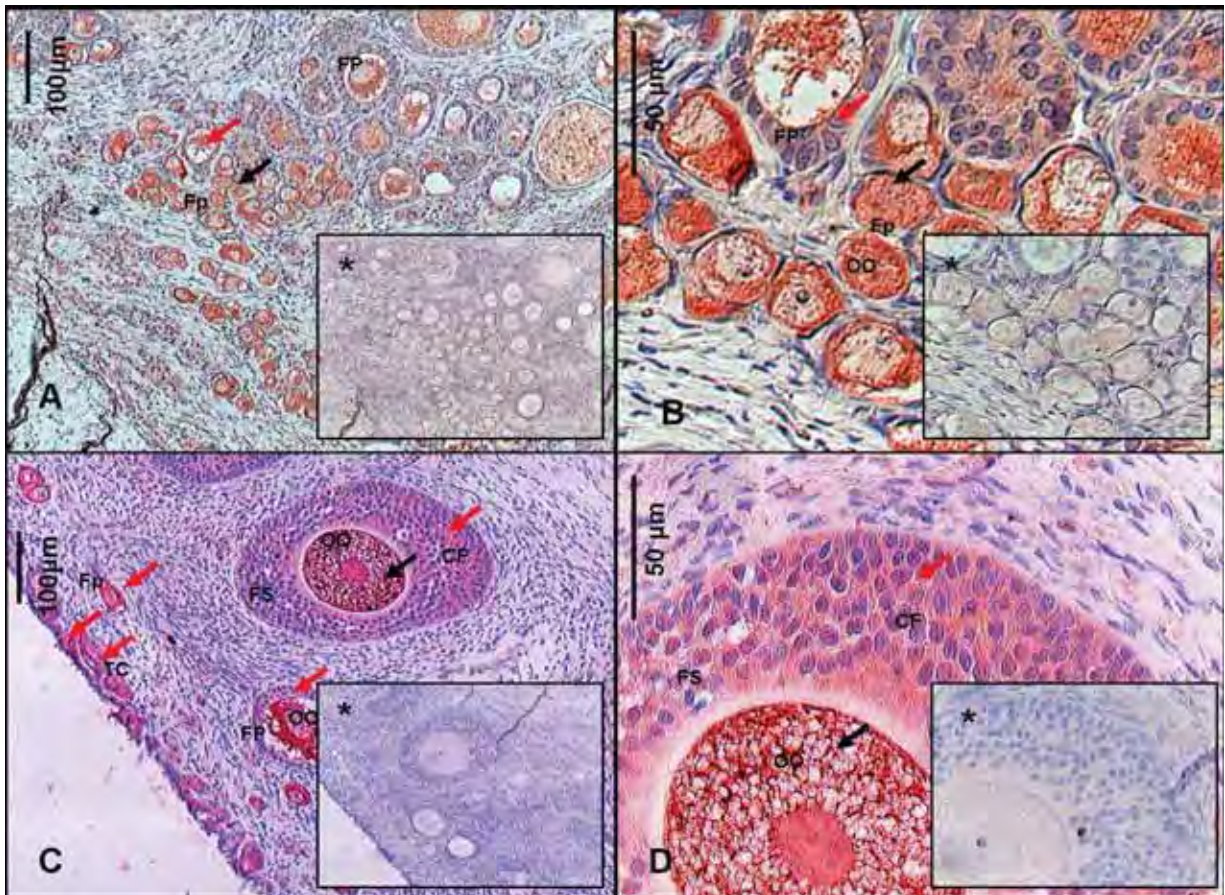


Figura 30 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovários de cadelas, demonstrando a imunolocalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) nas células foliculares de folículos primários (A,B), oócitos de folículos primordiais (A,B), túbulos corticais (C), epitélio superficial (C), oócitos de folículos primordiais (C) e células foliculares e oócitos de folículos secundários (C,D). Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas vermelhas indicam marcação positiva moderada. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. Fp (Folículos primordiais); FP (Folículos primordiais); FS (Folículos secundários); OO (Oócitos); CF (Células foliculares). Jaboticabal-SP, 2012.

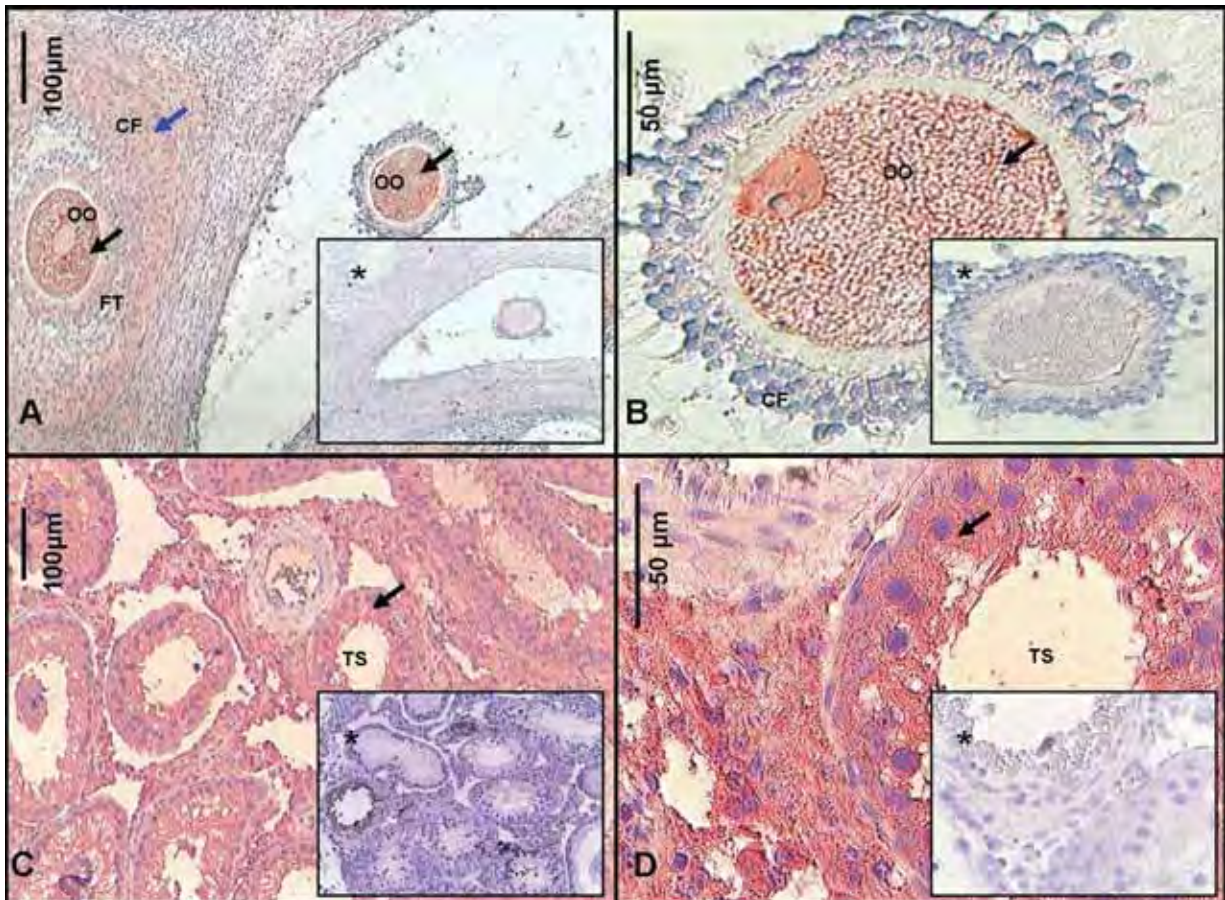


Figura 31 – Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário de cadela (A,B) e testículo de rato (C,D), demonstrando a imunolocalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) nas células foliculares de folículos terciários (A) e oócitos de folículos terciários (A,B) de ovário de cadelas e nos túbulos seminíferos de ratos (C,D), utilizados como controle positivo. Setas negras indicam marcação positiva intensa; setas azuis indicam marcação positiva leve. As imagens A e C foram obtidas na objetiva de 10x. As imagens B e D foram obtidas na objetiva de 40x. * correspondem ao controle negativo. FT (Folículos terciários); CF (Células foliculares); OO (Oócito); TS (Túbulos seminíferos). Jaboticabal-SP, 2012.

As figuras 32-35 demonstram as comparações entre os anticorpos quanto à intensidade de coloração e à porcentagem de células coradas para cada estrutura avaliada.

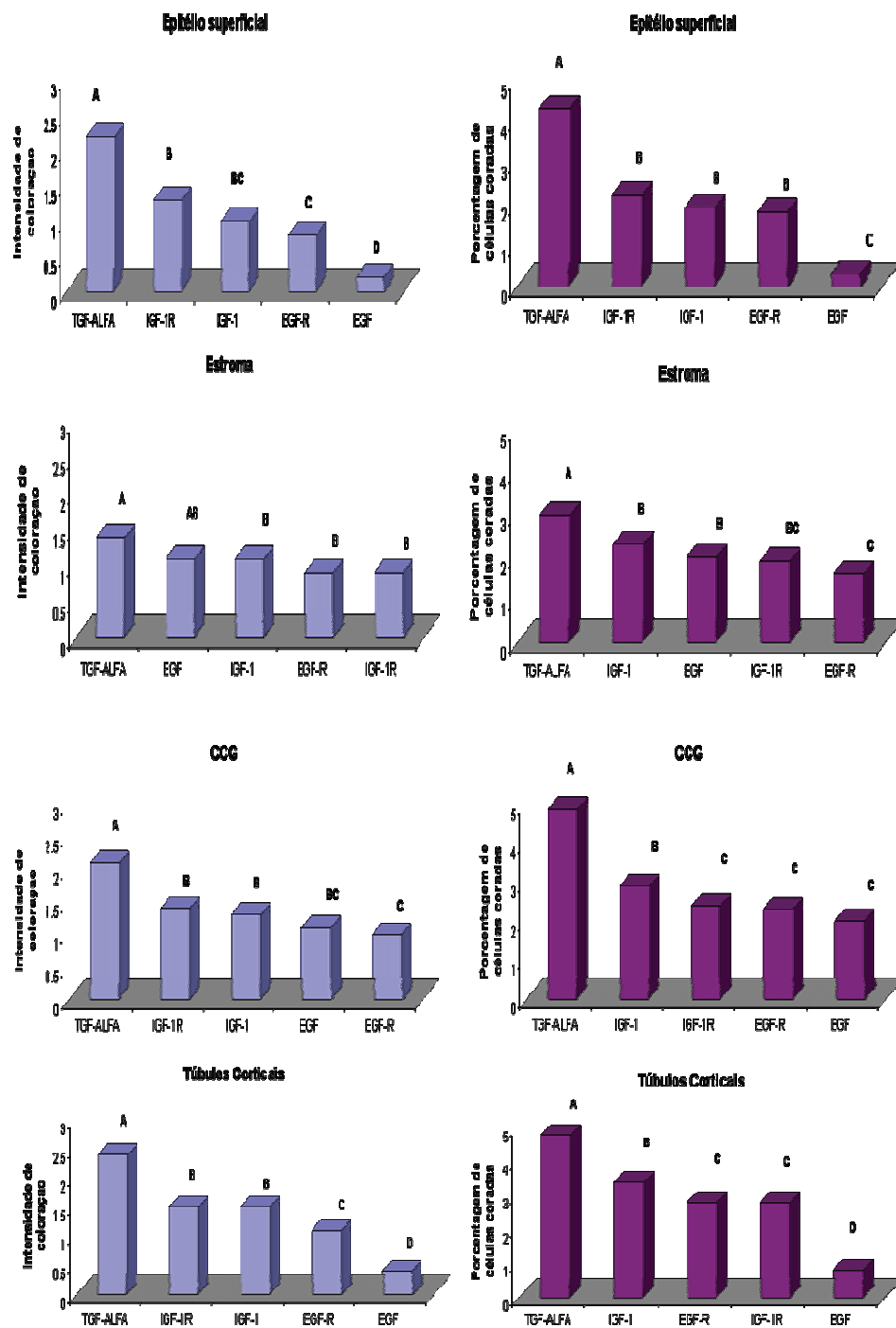


Figura 32 – Comparação da intensidade de coloração (azul) e porcentagem de células coradas (roxo) entre os anticorpos para cada estrutura avaliada. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

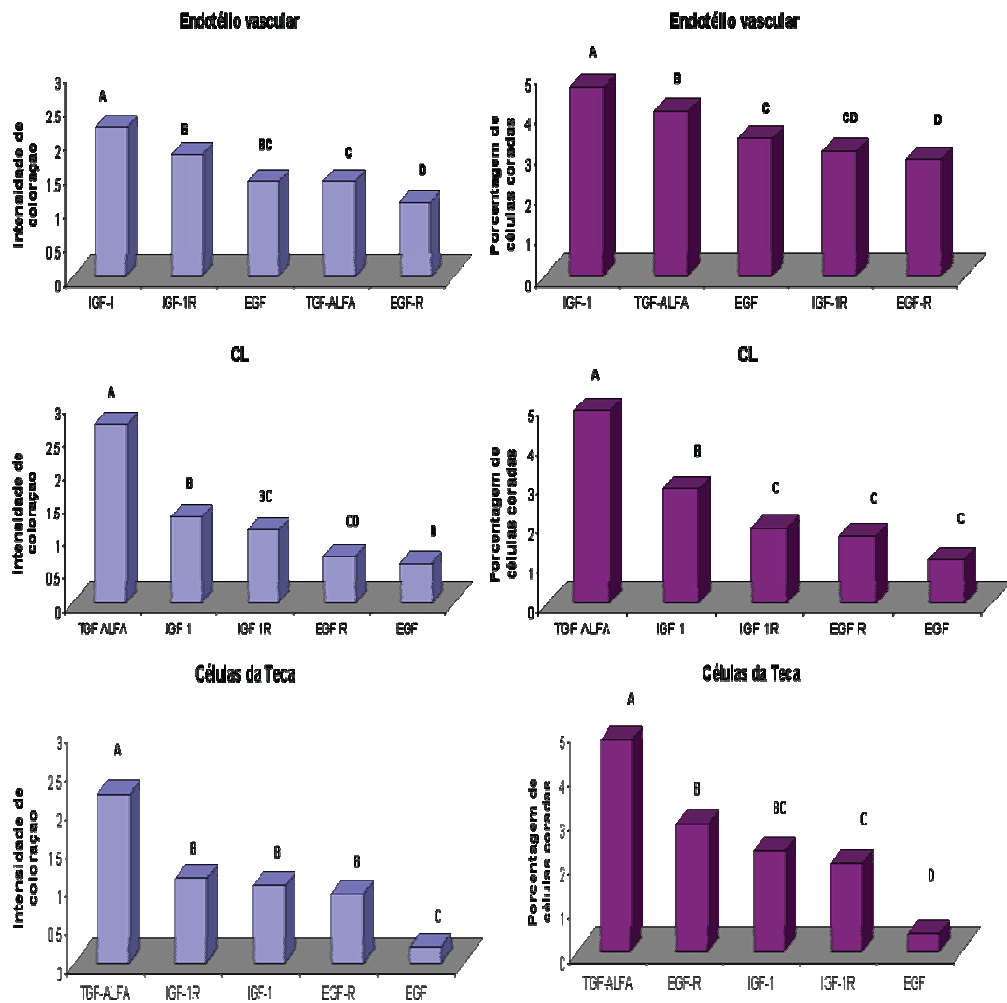


Figura 33 – Comparação da intensidade de coloração (azul) e porcentagem de células coradas (roxo) entre os anticorpos para cada estrutura avaliada. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

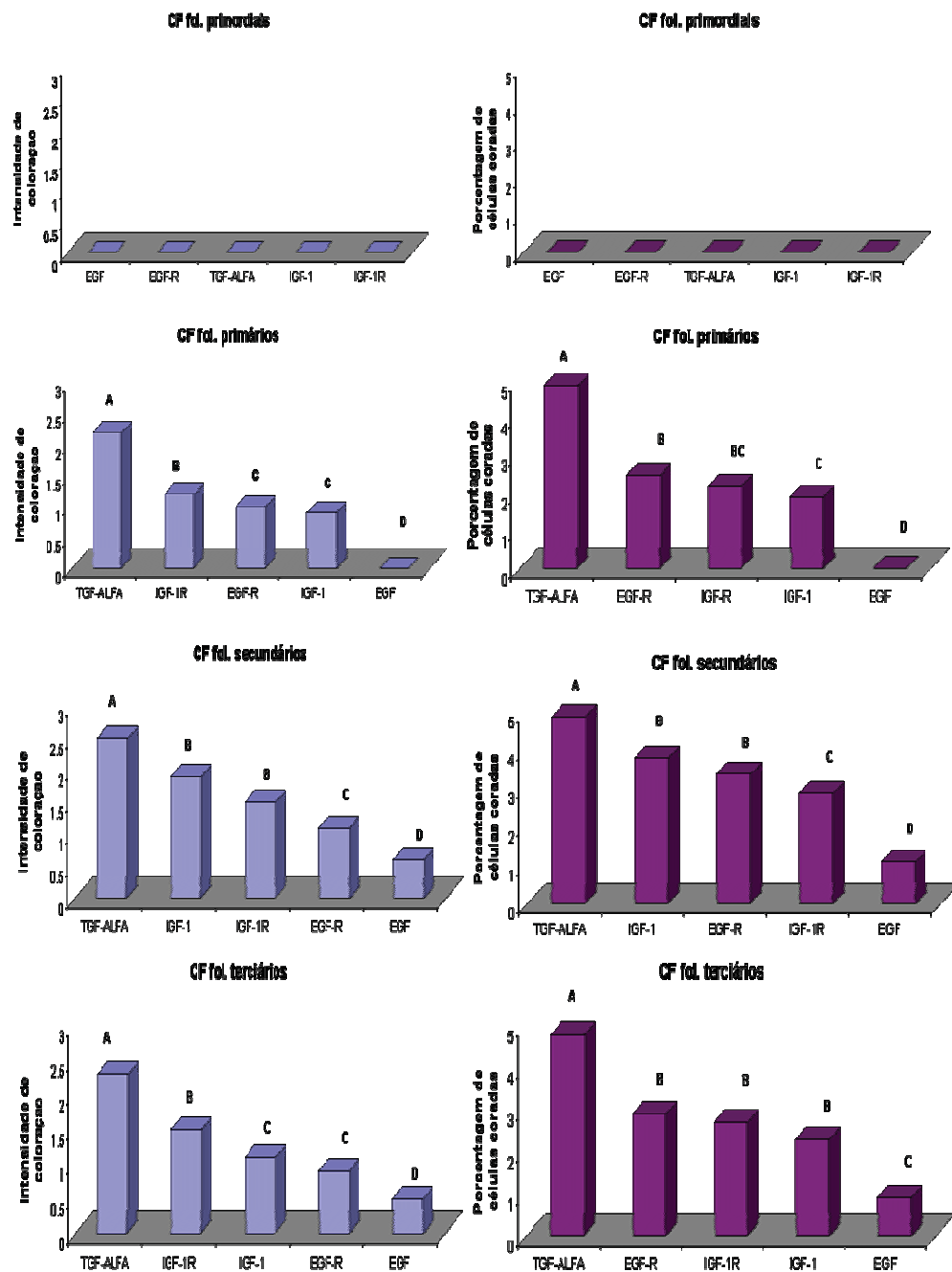


Figura 34 – Comparação da intensidade de coloração (azul) e porcentagem de células coradas (roxo) entre os anticorpos para cada estrutura avaliada. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

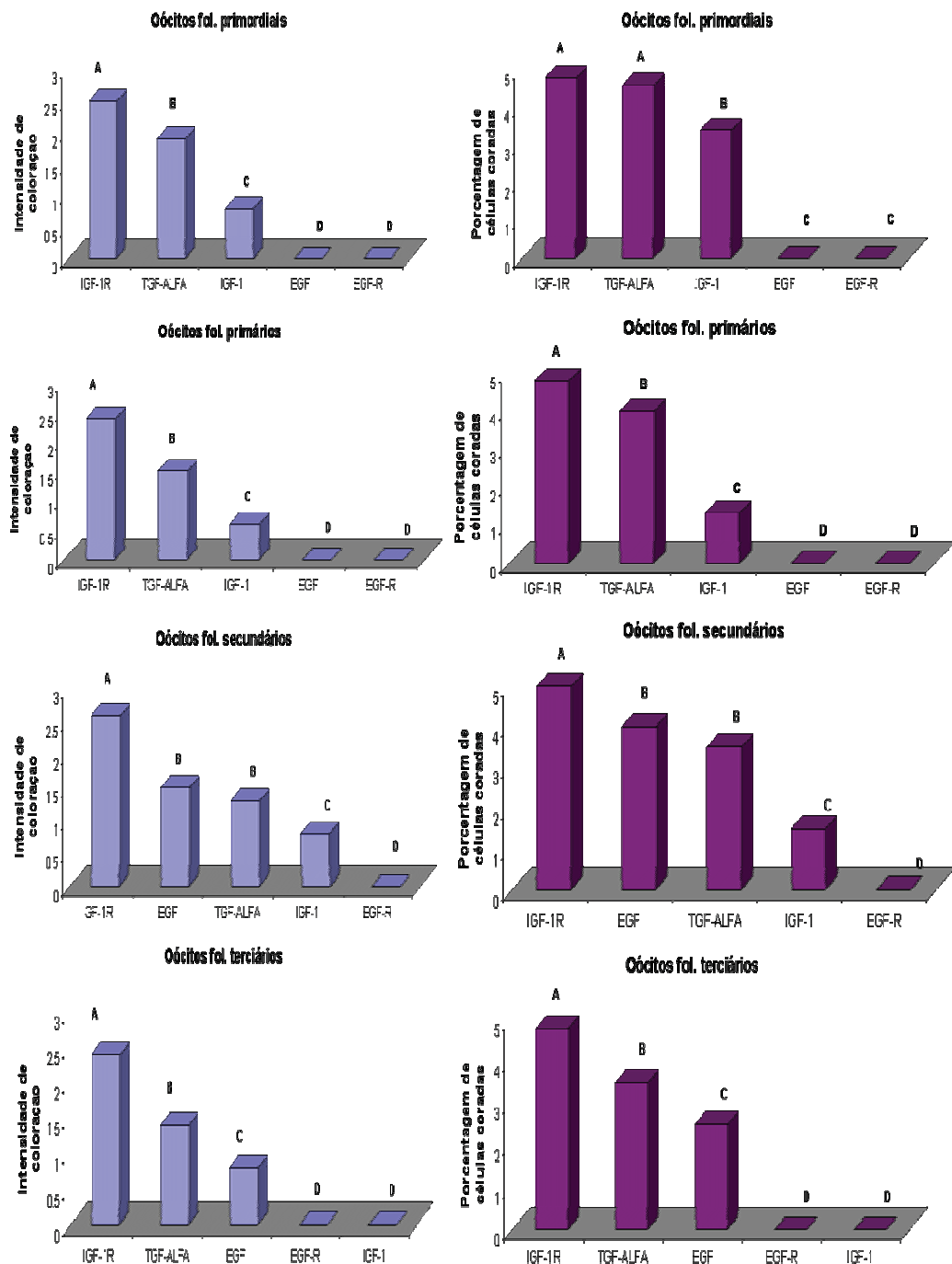


Figura 35 – Comparação da intensidade de coloração (azul) e porcentagem de células coradas (roxo) entre os anticorpos para cada estrutura avaliada. Letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Jaboticabal-SP, 2012.

Quando cada estrutura ovariana avaliada foi comparada quanto à intensidade de coloração e porcentagem de células coradas, para cada anticorpo, entre as diferentes fases do ciclo estral, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$).

7. DISCUSSÃO

STROM HOLST et al. (2001), RODRIGUES & RODRIGUES (2003) e LUVONI et al. (2005) relataram que não houve diferença significativa na taxa de recuperação de oócitos de cadelas de raça pura e sem raça definida, o que corrobora com o presente estudo. LUVONI et al. (2005) informaram que a idade da doadora influencia na quantidade de oócitos obtidos, fato não observado na atual pesquisa, onde não houve diferença entre cadelas adultas e peri-púberes.

Alguns autores relataram que o status reprodutivo não interfere na taxa de recuperação de oócitos (NICKSON et al., 1993; DURRANT et al., 1998; FUJI et al., 2000; RODRIGUES & RODRIGUES, 2003 e LUVONI et al., 2005, RIBEIRO, 2007), semelhante ao observado neste trabalho.

De um total de 840 oócitos grau I recuperados, 226 (26,9%) foram perdidos durante o procedimento de coloração nuclear, taxas de perdas semelhantes, após a etapa da hialuronidase, foram descritas por PIRES (2006) e MACHADO (2007).

Neste experimento, a adição de IGF-1 ou EGF ao meio de maturação não foi benéfica para a MIV de oócitos caninos. KIM et al. (2004) e CUI et al. (2006) demonstraram que o EGF melhorou os índices de maturação quando foram utilizados oócitos de cadelas em estro e 72 horas de maturação, diferente das condições utilizadas no presente estudo, em que foram utilizados oócitos de cadelas em diferentes fases do ciclo estral e com 96 horas de maturação. Já BOLAMBA et al. (2006) relataram que o EGF foi benéfico apenas em combinação com tratamento hormonal, e MACHADO et al. (2007) informaram que a adição de IGF-1 ao meio SOF não melhorou as taxas de MIV de oócitos caninos, semelhante ao encontrado neste trabalho.

Muitas pesquisas demonstraram que o IGF-1 e o EGF melhoraram as taxas de MIV em diversas espécies, entre elas: bubalinos (PUROHIT et al., 2005), bovinos

(SAKAGUCHI et al., 2000), ovinos (GULER et al., 2000), felinos (KITIYANANT et al., 2003) e suínos (SOMMER et al., 1992; DING & FOXCROFT, 1994; SIROTKIN et al., 2000).

As porcentagens de oócitos degenerados foram elevadas em todos os grupos, concordando com os achados de alguns autores (PIRES, 2006 e MACHADO, 2007). Tal fato pode ser explicado pelo tempo de maturação utilizado nesta pesquisa, que foi de 96 horas, o qual, segundo a literatura, pode chegar até a 120 horas (LUVONI et al., 2005). Quanto maior o tempo utilizado na MIV, menores serão os achados de VG e maiores os de QVG e MII, porém maiores serão também as porcentagens de oócitos degenerados (LUVONI et al., 2005). Algumas pesquisas relataram que o tempo de 72 horas seria o ideal para MIV de oócitos de cadelas (LUVONI et al., 2005). Outro fator que certamente contribuiu para o elevado número de oócitos degenerados foi utilização da coloração DAPI, a qual ainda não é consagrada na coloração nuclear de oócitos caninos. No grupo EGF, por exemplo, a taxa de oócitos degenerados foi maior e estatisticamente significativa na coloração DAPI, quando comparada com a HOESTCH, a qual já é consagrada nas pesquisas com MIV de caninos.

Com relação aos índices de oócitos que atingiram as fases de QVG, MI e MII, os dados ficaram aquém do esperado, porém semelhantes aos encontrados por PIRES (2006) e MACHADO (2007). Além do tempo de maturação, que pode ter aumentado a taxa de oócitos degenerados, a fase do ciclo estral pode explicar estes resultados, já que parte dos oócitos utilizados foram de cadelas em anestro e diestro.

A influência da fase do ciclo estral sobre a taxa de recuperação e frequência de maturação nuclear de oócitos ainda é controversa. Enquanto alguns pesquisadores indicaram que não há associação (RODRIGUES & RODRIGUES, 2003; APPARÍCIO-FERREIRA et al., 2011), outros demonstraram que o *status* reprodutivo da cadela influenciou a capacidade de desenvolvimento oocitário (OTOI et al., 2001; KIM et al., 2004) de tal forma que, oócitos obtidos durante a fase folicular (proestro e estro) apresentaram melhores índices de maturação do que oócitos recuperados de animais em outras fases reprodutivas (YAMADA et al., 1993; OTOI et al., 2001; KIM et al., 2004; SONGSASEN & WILDT, 2007).

As explicações para o efeito do estágio do ciclo estral sobre a competência meiótica são muitas. Segundo LUVONI et al. (2005), a influência do estágio do ciclo estral está relacionada com o *status* funcional das GAPjs entre o oócito e as células do *cumulus*. As baixas taxas de maturação durante o anestro seriam decorrentes da ausência de comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito. Já PIRES-BUTTLER (2010), em um estudo das características morfológicas do complexo *cumulus*-oócito canino, afirmou que embora oócitos provenientes de fêmeas em anestro e em fase folicular apresentem a mesma intensidade de comunicação entre as células do *cumulus*, sugerindo que estes oócitos possuam a mesma capacidade de retomada de meiose, os melhores índices de maturação *in vitro* foram alcançados em oócitos provenientes de animais em fase folicular. Provavelmente este fato decorra do maior grau de maturidade citoplasmática obtido pelos oócitos durante esta fase reprodutiva.

As controvérsias e as diferentes explicações sobre o efeito do estágio do ciclo estral sobre a competência meiótica reiteram a necessidade de mais estudos acerca deste assunto.

No presente estudo foram selecionados para MIV apenas oócitos grau I, com diâmetro maior que 100µm, conforme relatado na literatura (LUVONI et al., 2005). Sobre este aspecto, durante alguns anos a competência meiótica do oócito canino foi relacionada ao grau de crescimento atingido pelo oócito antes de ser liberado do folículo. Dessa forma, quanto maior o oócito, maior é a habilidade de transpor à fase de quebra da vesícula germinativa e atingir a metáfase II (HEWITT & ENGLAND, 1998; OTOI et al., 2001). No entanto, recentes estudos demonstraram que o fator que influencia a aquisição de competência meiótica é o diâmetro folicular e não o diâmetro oocitário (SONGSASEN et al., 2009), portanto, este pode ter sido mais um fator que contribuiu com o baixo índice de maturação encontrado.

O grupo M0 foi feito para avaliar o grau de maturação nuclear no momento da colheita dos oócitos. Enquanto que em outras espécies de mamíferos o oócito em fase de vesícula germinativa (prófase I) sofre reinício da meiose nas etapas finais da maturação folicular, sendo ovulado em metáfase II (já com a extrusão do primeiro corpúsculo polar), em canídeos os oócitos são liberados em estágio imaturo, no início

da primeira divisão meiótica, ainda em fase de vesícula germinativa (FARSTAD et. al., 1989). O presente estudo mostrou que os oócitos caninos apresentam maturação ainda dentro do folículo ou logo após a liberação dos folículos, após o *slicing*, já que foi encontrada grande quantidade de oócitos em quebra de vesícula (23,3%) e até em MI (4%).

A coloração HOESTCH é muito utilizada na avaliação do estágio de maturação nuclear de oócitos de cadelas (OTOI et al., 2001; KIM et al., 2004; LUVONI et al., 2005; MACHADO et al., 2007; RIBEIRO, 2007; PIRES, 2007; PIRES-BUTTNER, 2010; APPARÍCIO-FERREIRA et al., 2011). Com relação à coloração DAPI, alguns trabalhos foram encontrados com o uso deste método para a avaliação do estágio de maturação nuclear de oócitos de ovelhas, búfalas e ratas e os autores relataram que todos os estágios de maturação nuclear foram observados (MORI et al., 1998; YOUSAF & CHOCHAN, 2003; SHIRAZI et. al., 2008), porém em cadelas tal coloração ainda não havia sido utilizada.

A atual pesquisa mostrou que maior quantidade de oócitos em QVG, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), foi observada nos grupos IGF e EGF na coloração HOESTCH. Também no grupo EGF foi encontrado na coloração HOESTCH menor taxa de oócitos degenerados e em VG e maior índice de oócitos em MI sendo todos com diferenças significativas ($p < 0,05$). O grupo M0 também mostrou maior taxa de QVG e menor quantidade oócitos degenerados ($p < 0,05$) na coloração HOESTCH.

Tais resultados demonstraram maior eficiência da coloração HOESTCH em relação à DAPI na avaliação do estágio de maturação nuclear de oócitos de cadelas, já que a primeira apresentou maiores índices de oócitos em QVG e MI e menor número de oócitos degenerados, embora todos os estágios de maturação nuclear tenham sido observados na coloração DAPI, o que comprovou sua eficiência na avaliação do estágio de maturação nuclear de oócitos de cadelas.

Um sistema intra-ovariano para controle das funções ovarianas foi sugerido por diversos pesquisadores. Acredita-se que os fatores de crescimento, via parácrina, autócrina ou até mesmo endócrina, modulam os efeitos das gonadotrofinas hipofisárias no desenvolvimento folicular.

Os componentes da família EGF possuem uma extensa localização em todo o corpo. Em camundongos, a principal fonte de EGF é a glândula salivar (RALL et al., 1985) e nos humanos são as glândulas de Bruner no duodeno, mas precursores também foram encontrados no cérebro, pulmões, rins, próstata, musculatura estriada, testículos, ovários, útero, glândula mamária e fluidos como leite e saliva (CATTERTON, 1979; SPORN et al., 1983; LYNCH et al., 1987; SCHULTZ et al., 1987). Estudos *in vitro* demonstraram que o EGF pode ser produzido no ovário pelas células da teca, células intersticiais e por macrófagos (FUKUMATSU et al., 1995). Foi detectada expressão gênica do TGF-ALFA em ovários de ratas e de vacas, principalmente nas células da teca, enquanto que alguns estudos demonstraram que não existiu expressão gênica de EGF em ovários de ratas, sugerindo-se que o EGF possa ser produzido fora do ovário (REEKA et al., 1998).

O EGF e também o TGF-ALFA parecem estar envolvidos principalmente na fase inicial do desenvolvimento folicular, auxiliando na ativação de folículos primordiais, via estimulação do antígeno de proliferação nuclear (PCNA), que promove a proliferação e diferenciação das células da granulosa, que da forma inicial plana passam a cubóides, formando então o folículo primário (PICTON, 2000). Nesta fase, o EGF atua em conjunto com outras substâncias como: (1) cKIT (receptor) e KIT ligante, proteínas conhecidas como fatores de células tronco, que atuam principalmente na transição de folículo primordial a primário (DRIANCOURT et al., 2000; FORTUNE, 2003); (2) GDF-9 (*growth differentiation factor-9*) e BMP-15 (*bone morphogenetic protein-15*), ambos são membros da superfamília TGF-BETA, secretados pelos oócitos, tendo como alvo as células da granulosa, e estão envolvidos na transição de folículo primário a secundário (FORTUNE, 2003; MAZERBOUR & HSUEH, 2003); (3) gonodatrofinas, que apesar de sua importância estar relacionada com o desenvolvimento de folículos antrais, também atuam na fase inicial, já que pesquisas em ratos e humanos demonstraram, *in vitro*, que o LH e, principalmente, o FSH melhoram o desenvolvimento de folículos primordiais (FORTUNE, 2003; LOUHIO et al., 2000); (4) IGF-1, que nesta fase, em humanos, parece também estar envolvido na ativação do PCNA (PICTON, 2000; LOUHIO et al.,

2000), embora FORTUNE (2003) refere que o IGF-1 não apresenta efeito nesta fase do desenvolvimento folicular.

Apresentam também outras funções na reprodução de mamíferos como:(1) induzem diferenciação e proliferação das células da granulosa, (2) possuem efeito anti-apoptótico nas células da granulosa dos diferentes tipos de folículos e (3) mimetizam os efeitos do LH em folículos pré-ovulatórios, incrementando a produção de progesterona (REEKA et al., 2003).

ROY & GREENVALD (1990) imunolocalizaram o EGF em ovários de hamsters, e encontraram marcação positiva nas células da granulosa de folículos pré-antrais com mais de uma camada de células da granulosa, já FUKUMATSU et al. (1995), em ratas, referem marcação positiva também em folículos antrais, o que corrobora com o presente estudo, no qual as células da granulosa de folículos secundários (pré-antrais) e terciários (antrais) foram positivas para o EGF.

GARNETT et al. (2002) e ERGIN et al. (2008) imunolocalizaram, respectivamente, em ovários de hamsters e ratas, o EGF-R nas células da granulosa e nas células da teca em todas as etapas do desenvolvimento folicular, semelhante a atual pesquisa, porém também imunolocalizaram o EGF-R nos oócitos, fato não observado neste experimento.

No presente estudo, a intensidade de coloração para o EGF-R foi maior ($p < 0,05$) nas células foliculares de folículos primários e secundários (pré-antrais) do que em folículos terciários (antrais), o que está de acordo com os resultados obtidos por ERGIN et al. (2008), em um estudo com ovários de ratas. O TGF-ALFA apresentou maior ($p < 0,05$) intensidade de coloração e porcentagem de células coradas em oócitos de folículos primordiais do que nos demais oócitos. Com base nos resultados acima elucidados, sugere-se maior atuação do EGF/TGF-ALFA na fase inicial do desenvolvimento folicular, apesar de o EGF não ter sido imunolocalizado em folículos primordiais e primários (apenas seu receptor foi localizado), fato que pode ter ocorrido devido ao EGF estar ligado ao seu receptor, ou que seria o TGF-ALFA o fator atuante nesta fase.

REEKA et al. (1998) trabalhando com ovários humanos, também relataram que o EGF e o TGF-ALFA estariam envolvidos no desenvolvimento de folículos pré-antrais, no entanto, para o EGF-R encontraram marcação positiva apenas nas células da granulosa de folículos antrais, diferente do encontrado nesta pesquisa. Os mesmos autores observaram que o TGF-ALFA e o EGF estão presentes também no corpo lúteo, assim como no atual estudo.

A localização nuclear do EGF-R está ligada ao estado de proliferação dos tecidos e já foi descrita no útero e mucosa oral de camundongos e tumores humanos. A interação do EGF/TGF-ALFA com seu receptor leva a fosforilação desse receptor e consequente translocação do complexo EGF/EGF-R para o núcleo da célula, onde ocorrerá a transcrição gênica (LIN et al., 2000). O tecido ovariano apresenta estruturas com grande capacidade de proliferação celular, como os folículos, o que pode explicar a marcação nuclear do EGF-R. A localização citoplasmática do EGF e do TGF-ALFA foi semelhante a todos os resultados encontrados na literatura (REEKA et al. 1998; OLIVA-HERNÁNDEZ & PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008) .

O IGF-1 é produzido no fígado e também, segundo a literatura, pode ser produzido no ovário. Atua na fase inicial de desenvolvimento folicular (pré-antrais) e também na fase final (folículos antrais), onde é muito importante no momento da seleção do folículo dominante, ou seja, na divergência folicular (PICTON, 2000; LOUHIO et al. 2000; FORTUNE et al., 2001; ZULU et al., 2002; FORTUNE, 2003).

O IGF-1 apresenta inúmeras funções na reprodução humana e dos animais domésticos. Pesquisas demonstraram que a maior expressão gênica de IGF-1 em tecido ovariano está nas células da granulosa, no entanto, também existe expressão nas células da teca, corpo lúteo e fluido folicular. A ligação do IGF-1 com seu receptor é estimulada pelo FSH e também pelo estrógeno (ZULU, 2002).

As principais funções deste fator de crescimento são: (1) proliferação e diferenciação das células da granulosa; suporte para a esteroidogênese ovariana, por meio da indução de receptores de LH e estímulo da atividade da aromatase; (2) papel fundamental na seleção do folículo dominante, onde o FSH estimula a produção de proteases que degradam as IGFbps foliculares, proteínas de baixo peso molecular que

se ligam ao IGF-1, inibindo suas funções, desta forma as concentrações de IGF-1 intra-foliculares aumentam, propiciando elevação da produção de estrógeno e LH, necessários para a dominância folicular e posterior ovulação; (3) modulador das funções do hipotálamo e da hipófise anterior, ou seja, pode estimular a liberação de GnRH pelo hipotálamo e de gonadotrofinas pela hipófise anterior, visto que em muitas espécies foi detectado aumento nas concentrações séricas de IGF-1 durante a puberdade; (4) atua na formação e nas funções do corpo lúteo; (5) possui efeito anti-apoptótico nas células da granulosa (FORTUNE et al., 2001; ZULU, 2002, DISKIN et al, 2003; FORTUNE et al., 2004).

Devido atuar tanto no estágio inicial do desenvolvimento folicular (folículos pré-antrais), quanto no estágio final (folículos antrais), e também por exercer várias funções, atuando em diferentes tipos de células ovarianas, o IGF-1 e seu receptor, neste experimento, apenas não foram imunolocalizados nas CF de folículos primordiais; este fato aliado a maior ($p < 0,05$) intensidade de coloração e porcentagem de células coradas nas CF de folículos secundários e terciários, quando comparadas as CF de folículos primordiais e primários, sugere-se maior atividade do IGF-1 em estágios mais avançados do desenvolvimento folicular em cadelas, o que corrobora com FORTUNE et al. (2001), ZULU et al. (2002) e FORTUNE (2003).

ERGIN et al. (2008) informaram que o IGF-1 foi imunolocalizado nas células foliculares de folículos primordiais, primários, secundários e terciários, assim como nos oócitos de todos os tipos de folículos, resultados também observados na presente pesquisa, exceto com relação as células foliculares de folículos primordiais, que apresentaram-se negativas ao IGF-1. ORTEGA et al. (2007) relataram, após pesquisas com ovários de ratas, que as células foliculares de folículos secundários e terciários, estroma ovariano e células luteínicas, apresentaram marcação positiva para o IGF-1, fato que também foi comprovado no presente estudo.

COCK et al. (2002) observaram marcação positiva para o IGF-1 na parede dos vasos do útero de cadelas, semelhante ao encontrado neste experimento em ovários de cadelas.

Nesta pesquisa, o IGF-1 apresentou localização nuclear enquanto seu receptor localizou-se no citoplasma das células, o mesmo foi encontrado por GEE et al. (2005), em amostras de neoplasias mamárias humanas e por ERGIN et al. (2008), em ovários de ratas, entretanto, COCK et al. (2002), em pesquisa com útero de cadelas e ORTEGA et al. (2007), em ovários de ratas, referiram marcação citoplasmática para o IGF-1. Nada foi encontrado na literatura que pudesse explicar esses resultados.

Segundo VERMEISCH et al. (2001), os CCG são oriundos de folículos secundários atrésicos e apresentam marcação positiva para receptores de progesterona, portanto devido sua origem e a seu envolvimento hormonal, justifica-se a marcação positiva desta estrutura para os fatores de crescimento avaliados neste estudo, os quais foram imunolocalizados em folículos secundários de ovários de cadelas. Os mesmos autores referiram marcação positiva para receptores de progesterona no epitélio superficial e nos túbulos corticais do ovário de cadelas, os quais são invaginações do epitélio superficial e sugere-se que suas células originariam as células foliculares e as células do estroma ovariano, o que pode explicar a marcação positiva destas estruturas para os fatores de crescimento na atual pesquisa.

Não houve diferença significativa entre as estruturas ovarianas avaliadas neste trabalho nas diferentes fases do ciclo estral para todos os anticorpos. Entretanto, TAMADA et al. (2005) verificaram marcação positiva de maior intensidade para o TGF-ALFA e EGF-R no útero de cadelas durante o proestro e estro e COCK et al. (2002), imunolocalizaram o IGF-1 no útero de cadelas com hiperplasia endometrial cística e no útero normal e, apesar de não terem estudado o IGF-1 no útero nas diferentes fases ciclo estral, informaram que seria esperado maior intensidade de marcação do IGF-1 no útero de cadelas em estro. Tais pesquisas demonstraram que o estrógeno pode aumentar a expressão gênica do TGF-ALFA, EGF e IGF-1 nas células uterinas de cadelas.

8. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, o EGF e o IGF-1 não são benéficos à MIV de oócitos caninos.

A coloração DAPI pode ser utilizada na avaliação do estágio de maturação nuclear de oócitos caninos.

O IGF-1, EGF e TGF-ALFA, assim como seus receptores, estão presentes em ovários de cadelas.

O IGF-1 está presente em maior número de estruturas ovarianas que o EGF, com maiores intensidade de coloração e porcentagem de células coradas.

Sugere-se que o IGF-1 e o EGF participem em todas as fases do desenvolvimento folicular de cadelas, porém o IGF-1 apresenta maior atuação em fases mais avançadas do desenvolvimento folicular (a partir de folículo secundário), enquanto que o EGF apresenta maior atuação no início.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPARÍCIO, M.; ALVES, A.E; PIRES-BUTTLER, E.A.; RIBEIRO, A.P.C.; COVIZZI, G.J.; VICENTE, W.R.R. Effects of hormonal supplementation on nuclear maturation and cortical granules distribution of canine oocytes during various reproductive stages. **Reproduction in Domestic Animal**. Article first published online: 24 feb 2011.

APPARÍCIO, M. A. **Efeito da suplementação de hCG, progesterone e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática in vitro de oócitos de cadelas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingohisterectomia**. 2006. 64f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BOGLIOLO, L.; ZEDDA, M.T.; LEDDA, S.; LEONI, G.; NAITANA, S.; PAU, S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.42, n.3, p.265-273, 2002.

BOLAMBA D. et al Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.65, p.1037–1047, 2006.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.D.; DURRANT, B.S. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.933-942, 1998.

BOLAMBA, D.; RUSS, K.D.; OLSON, M.A.; SANDLER, J.L.; DURRANT, B.S. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology**, v.58, p.1689-1703, 2002.

BORTOLOTTO, E.B. et al. Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinal e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.1-10, 2001.

CATTERTON, W.Z; ESCOBEDO, M.B.; SEXSON, W.R; GRAY, M.E.; SUNDELL, H.W; STAHLMAN, M.T. Effect of epidermal growth factor on lung maturation in fetal rabbits. **Pediatric research**, v.13, n.2, p.104-108, 1979.

COHEN, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. **Journal of Biological Chemistry**, v.237, p.1555–1562, 1962.

CONCANNON, P.W.; McCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy, and parturition in the dog. **Journal of Reproduction & Fertility**, Supplement, v.39, p.3-25, 1989.

COONS, A. H. The beginnings of immunofluorescence. **Journal Immunology**, v.87, n. p. 499, 1961.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Maywood, 1941, p. 200-202.

CUI, X. Y., et al. Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. **Theriogenology**. v. 66, p. 267–274, 2006.

DE COCK, H.; DUCATELLE, R.; TILMANT, K.; DE SCHEPPER, J. Possible role for Insulin like growth factor-1 in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia piometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v.57, p. 2271-2287, 2002.

DERYNCK, R., ROBERTS, A., WINKLER, M.E. Human transforming growth factor- α , precursor structure and expression in E. coli. **Cell**, v.38, p.287–297, 1984.

DEW, E.V. **In vitro maturation of the canine oocyte**. 56f. Thesis (Master of Sciences) – University of Georgia, 2001.

DING, J.; FOXCROFT, G. R. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. **Molecular Reproduction and Development**, v.39, p.30–40, 1994.

DISKIN M.G, MACKEY D.R., ROCHE J.F., SREENAN J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.345-370, 2003.

DRIANCOURT M.A.; REYNAUD K.; CORTVRINDT R.; SMITZ J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.143-152, 2000.

DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, n.5, p.917-932, 1998.

ERGIN K.; GURSOY, E.; KOCA Y. B.; BASALOGLU, H.; SEYREK, K. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I, transforming growth factor-b2, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in developing rat ovary. **Cytokine**, v.43, p.209–214, 2008.

FARSTAD, W. MONDAIN-MONVAL M., HYTTEL P., SMITH A.J., MARKENG D. Periovulatory endocrinology and oocyte maturation unmated, mature blue fox vixens (*Alopex lagopus*). **Acta veterinaria Scandinavica**, v.30, p.313-319, 1989.

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v.52, p.175-186, 2000.

FORTUNE, J.E., RIVERA G.M., EVANS A.C.O., TURZILLO A.M. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FOTUNE, F.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.135-163, 2003.

FORTUNE J.E., RIVERA G.M., YANG M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 109–126, 2004.

FUJI M, OTOI T., MURAKAMI M., TANAKA M., UNE S., SUZUKI T. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.62, n.3, p. 305–7, 2000.

FUKUMATSU, Y.; KATABUCHI, H.; OKAMURA, H. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor and its effect on granulosa cell proliferation in rat ovary. **Endocrine Journal**, v.42, n.4, p.467-473, 1995.

GARNETT, K., WANG, J., ROY, S.K. Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage-specific

differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1593–1604, 2002.

GEE J. M., ROBERTSON J. F., GUTTERIDGE E., ELLIS I. O., PINDER S. E., RUBINI M., NICHOLSON R. I. Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v.12, p.99-111, 2005.

GIMENO, E. J. Fundamentos de imunoistoquímica aplicada a patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGISTAS VETERINÁRIOS, 7.,1995, Belo Horizonte. **Anais do VII Encontro Nacional de Patologistas Veterinários**, Belo Horizonte, 1995, p.17-51.

GIORDANO, M.G.; OLIVEIRA, C.A.B. Immunohistochemical analysis of IGF-1 and IGF-2 receptors in ovaries of patients with polycystic ovary syndrome. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v.87, p.256-257, 2004.

GREENWALD, G.S.; TERRANOVA, P.F. **Follicular selection an its control**. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D.; et al. *The physiology of reproduction*, Cap.11, p.387-488, 1988.

GULER, A. et al. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v.54, p.209-218, 2000.

HADLEY, M.C. Growth hormones. In_. **Endocrinology**. 2. ed. Cap.12, p.266-298, 1988.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.51, p.91-108, 1997.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. **Veterinary Record**. v.144, p.237-239, 1999.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of oocyte size and bitch age upon nuclear maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v.49, p.957-966, 1998a.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v.143, p.590-591, 1998b.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of pre-ovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.51, n.83-91, 1997.

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, p.1083-1101, 1998.

HEYNER, S. SHAH, N.; SMITH, R.M. et al. The role of growth factors in embryo production. **Theriogenology**, v.39, p.151-161, 1993.

KIM, M.K.; FIBIRANTO, Y.H; HYUN, J.O.; GOO JANG, H.J.O.; KIM, H.J.; LEE, K.S.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effect of mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. **Journal Veterinary Science**, v.5, n.3, p.253-258, 2004.

KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, J.; PAVASUTHIPAISIT, K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. **Theriogenology**, v.59, p.1775-1786, 2003.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Fertilização e clivagem. In: PRESTES, N.C; LANDIM-ALVARENGA, F.C. **Obstetrícia Veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.1, p.1-19, 2006.

LIN, S. Y. et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. **Nature cell biology**, v.3, p. 802-808, 2001.

LOUHIO, H., HOVATTA, O., SJÖBERG, J., TUURI, T., The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Molecular Human Reproduction**, v.6, p.694–698, 2000.

LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; GANDOLFI, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D.T. Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. **Biology of Reproduction**, v.63, p.1580-1585, 2000.

LUVONI, C.G. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. **Reproduction Nutrition Development**, v.40, p.505-512, 2000.

LUVONI, G.C.; CHIGIONI, S.; ALLIEVI, E.; MACIS, D. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.41-59, 2005.

LYNCH, S.E.; NIXON, J.C.; COLVIN, R.B.; ANTONIADES, H.N. Role of platelet derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v.84, n.21, p.7696-7700, 1987.

MACHADO, M.A.; TONIOLLO, G.H.; OLIVEIRA, K.S. Influência do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) adicionado ao meio fluido sintético da tuba uterina (SOF) sobre a maturação *in vitro* de oócitos caninos (*canis familiares*). **Semina**, v.28, n.3, p.455-464, 2007

MARTINS, L.R. **Maturação nuclear de ovócitos de cadelas em estro e anestro submetidas à maturação in vitro**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

MAZERBOURG S., HSUEH A.J.W. Growth differentiation factor-9 signaling in the ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology** , v.202, p.31- 36, 2003.

MAZERBOURG, S.; BONDY, C.A.; ZHOU, J.; MONGET, P. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.247–58, 2003.

MORI, C.; HASHIMOTO, H.; HOSHINO, K. Fluorescence microscopy of nuclear DNA in oocytes and zygotes during *in vitro* fertilization and development of early embryos in mice. **Biology of Reproduction**, v.39, p.737-742, 1988.

NAGANO, M.; UCHIKURA, K.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M. Effect of duration of *in vitro* maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. **Theriogenology**, v.69, p.231-236, 2008.

NICKSON, D.A.; BOYD, J.; ECKERSALL, P.D.; FERGURSON, J.M.; HARVEY, M.J.A.; RENTON, J.P. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement, v.47, p.231-240, 1993.

OLIVA-HERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F. Localization of the epidermal growth factor (EGF) in the epididymis and accessory genital glands of the boar and functional effects on spermatozoa. **Theriogenology**, v.70, p.1159-1169, 2008.

OLIVEIRA, K. S. **Perfil imunohistoquímico da expressão da proteína *cyr61* e da proteína quinase ativada por mitógeno em próstatas de cães**. 2005. 69f. Dissertação (mestrado). Escola de veterinária da UFG. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

OLIVEIRA, S. R. **Detecção de *Haemophilus parasuis* por meio da técnica de imunoperoxidase em suínos experimentalmente infectados**. 1998. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

ORTEGA H. H., SALVETTI N. R., AMABLE P., DALLARD B. E., BARAVALLE C., BARBEITO C. G., GIMENO E. J. Intraovarian Localization of Growth Factors in Induced Cystic Ovaries in Rats. **Anat. Histol. Embryol.** v.36, p.94-102, 2007.

OSCAKIR, H.T.; GIRAY S.G.; OZBILGIN, M.K.; UYAR, Y.; LACIN, S.; CAGLAR, H. Immunohistochemical detection of transforming growth factor- α , epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor expression in hyperstimulated rat ovary. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.8, p. 887-893, 2005.

OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v.54, p.535-542, 2000.

PARIA, B.C.; DEY, S.K. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. **Developmental Biology**, v.87, p.4756-4760, 1990.

PEREZ, J.F.; CONLEY, A.J.; DIETER, J.A.; SANZ-ORTEGA, J.; LASLEY, B.L. Studies on the origin of ovarian interstitial tissue and the incidence of endometrial hyperplasia in domestic and feral cats. **General and comparative endocrinology**, v.116, p.10-20, 1999.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, p.1193-1210, 2001.

PIRES, E.A. **Efeito da Suplementação de Cisteína e Cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro**. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PIRES-BUTTLER, E.A. **Efeito do estágio do ciclo estral e adição de hormônios ao meio de cultivo *in vitro* sobre a morfologia do complexo *cumulus*-oócito canino**. 2010. 164f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

PUROHIT, G.N, BRADY, M.S. SHARMA, S.S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. **Animal Reproduction Science**. v.87 p.229–239, 2005.

RALL, L.B.; SCOTT, J.; BELL, G.I.; CROWFORD, R.J.; PENSCHOW, J.D.; NIALL, H. D.; COGHLAN, J.P. Mouse prepro-epidermal growth factorsynthesis by the kidney and other tissues. **Nature**, v.313, p.228-231, 1985.

REEKA N.; BERG F.D.; BRUCKER, C. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. **Human Reproduction**, v.13, n.8, p.2199–2205, 1998.

RIBEIRO, A.P.C. **Influência do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação in vitro de oócitos de fêmeas caninas**. 2007. 129f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. **Theriogenology**, v.60, p.59-66, 2003.

ROY, S.K., GREENWALD, G.S. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. **Endocrinology**, v. 126, p.1309-1317. 1990

SAINT-DIZIER, M.; SALOMON, J.F.; PETIT, C.; RENARD, J.P.; CHASTANTMAILLARD, S. *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, suppl., p.147-150, 2001,.

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. **Theriogenology**, v.64, p.1327-1342, 2000.

SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; FIRST, N.L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction**, v.123, p.135-142, 2002.

SCHULTZ, G.S.; WHITE, M.; MITCHELL, R.; BROWN, G.; LYNCH, J.; TWARDZIK; D.R.; TODARO, G.J. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor alfa and vaccine growth factor. **Science**, v.235, p.350-352, 1987.

SHIRAZI, A. SHAMS-ESFANDABADI N., AHMADI E., HEIDARI B. Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**., v.45, p.530-536, 2008.

SINGHAL, S.; PRASAD, S. SINGH, B.; PRASAD, J. .K; GUPTA, H. P. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. **Animal Reproduction Science**, v.113, n.1, p.44-50, 2009.

SIROTKIN, A. V.; DUKESOVÁ, J.; MAKAREVICH, A. V.; KUBEK, A.; BULLA, J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. **Reproduction Nutrition Development**, v.40, p.559-569, 2000.

SOMMER, P.; RATH, D.; NIEMANN, H. In vitro maturation of porcine oocytes in the presence of follicular granulosa cells, FSH and/or EGF. In: **International Congress on Animal Reproduction, 1992, The Hague. Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, The Hague**: v.1, p.378-380, 1992.

SONGSASEN, N.; YU, I.; LEIBO, S.P. Effects of maturation media and oxygen concentration on nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.494, 2001.

SONGSASEN, N. et al. Follicular morphology, oocyte diameter and localization of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, suppl. 2, p.65-70, 2009

SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B.; SHULL, J.H.; SMITH, J.M.; WARD, J.M. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. **Science**, v.19, p.1329-1331, 1983.

STROM HOLST, B.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LAGERSTEDT A.S.; LINDE-FORSBERG, C. Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. **Journal of Veterinary Medicine A**, v.48, p.587–92, 2001.

TAMADA, H.; TOMINAGA, M.; KIDA, K.; KAWATE, N.; INABA, T.; MATSUYAMA, S.; SAWADA, T. Detection of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor mRNA and immunohistochemical localization of the corresponding proteins in the canine uterus during the estrous cycle. **Histology and Histopathology**, v.20, p. 817-824, 2005.

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. 77f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; CORYN, M.; VAN DEN BROECK, W. Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. **Reproduction**, v.122, p.73-83, 2001.

YAMADA, S. et al. Maturation, fertilization and development of dog oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v.46, p.853-858, 1993

YOUSAF, M. R.; CHOHAN, K. R. Nuclear morphology, diameter and meiotic competence of buffalo oocytes relative to follicle size. **Reproduction, Fertility and Development**. v.15, p,223- 229, 2003.

YU, N.; ROY, S. Developmental of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary in vitro: effect of insulin. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1558-1567, 1999.

ZELZNIK, A.J.; BENYO, D.F. **Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates**. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 49, p.751-782, 1994.

ZULU, V.C.; NAKAO, T.; SAWAMUKAY, Y. Insulin like growth factor-1 as possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v, 64, p. 657-665, 2002.