

AVALIAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO IGF-I NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS CANINOS NO MEIO TCM 199

KELLEN DE SOUSA OLIVEIRA,¹ MARCO ANTÔNIO MACHADO² E
GILSON HÉLIO TONIOLLO³

-
1. Pós-doutoranda pela FCAV/Unesp. E-mail: ksoliver13@hotmail.com
 2. Professor doutor do Departamento de Clínicas Veterinárias da UEL-PR
 3. Professor titular do Departamento de Medicina Veterinária e Reprodução Animal, FCAV/Unesp

RESUMO

Objetivou-se avaliar a adição do fator de crescimento recombinante IGF-I na concentração de 100ng/mL em 500µL de meio TCM 199 na maturação *in vitro* de oócitos caninos. Avaliou-se, com isso, o grau de maturação citoplasmática e nuclear por meio de coloração com isotiocianato de fluoresceína (*Lens cullinaris*) e Hoeschst

33342, respectivamente, em microscópio epifluorescente filtro FITC: excitação 490nm e emissão 520nm. Como resultado, verificou-se que não houve diferenças estatísticas entre os grupos controle e tratamento na maturação *in vitro*, citoplasmática e nuclear, de oócitos caninos pelo teste Kruskal-Wallis com nível de significância 5%.

PALAVRAS-CHAVES: Cães, IGF-I, maturação, oócito.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE GROWTH FACTOR IGF-I IN THE *IN VITRO* MATURATION OF CANINE OOCYTES IN THE TCM 199 MEDIUM

The aim was to evaluate the supplementation of recombinant IGF-I growth factor at concentration of 100ng/mL in 500µL of TCM 199 medium in the *in vitro* maturation of canine oocytes. The oocytes were stained with isotiocyanate of fluorescein (*Lens cullinaris*) and Hoeschst 33342 for nuclear and cytoplasmatic assessment using an

epifluorescence microscope (filter FITC: excitement 490nm and emission 520nm). There were no statistical differences between control and supplemented groups regarding cytoplasmatic and nuclear maturation when using Kruskal-Wallis test, $p < 0,05$.

KEY WORDS: Canine, IGF-I, maturation, oocyte.

INTRODUÇÃO

As biotécnicas da reprodução possuem atualmente importância primordial no manejo reprodutivo assistido, pois são ferramentas inovadoras no controle de mecanismos fisiológicos, além de auxiliar o estudo da reprodução em

diferentes espécies animais (VANNUCCHI, 2003). O conhecimento das biotécnicas da reprodução, em canídeos e felídeos, é de fundamental importância para a preservação de espécies ameaçadas de extinção dessas famílias. O cão e o gato doméstico são os modelos experimentais mais utilizados para realização e padronização dessas

biotécnicas, antes de colocá-las em prática com animais selvagens.

Na maioria das espécies, o oócito em estágio de vesícula germinativa (prófase I) sofre meiose nas etapas finais da maturação folicular e é ovulado em estágio de metáfase II (já com o primeiro corpúsculo polar expulso). A segunda divisão meiótica completa-se durante a penetração do espermatozoide (CONCANNON et al., 1989; GUÉRIN, 1998). Os cães (*Canis familiaris*), diferentemente das outras espécies, possuem peculiaridades em sua fisiologia reprodutiva. O oócito canino, no momento da ovulação, é imaturo e se encontra em estágio de vesícula germinativa e, para seu completo desenvolvimento *in vivo*, necessita de um período de 48 a 72 horas para retomada da meiose e metáfase II (MII), passando pela maturação e fertilização dentro da tuba uterina (TSUTSUI, 1989; YAMADA et al., 1992). As concentrações hormonais são diferenciadas, pois ocorre luteinização pré-ovulatória, ou seja, a maturação oocitária dá-se em concentrações crescentes de progesterona (CONCANNON et al., 1989; GUÉRIN, 1998).

Os protocolos de fecundação *in vitro* preveem duas técnicas para obtenção de oócitos. Uma delas, e a mais utilizada, se dá a partir de ovários provenientes de cadelas submetidas à ovariectomia ou à ovário-histerectomia. Isso porque a localização do folículo no tecido ovariano da cadela é cortical, o que dificulta a punção folicular, esta a segunda técnica preconizada (HEWITT et al., 1998; OTOI et al., 2000). A técnica de fatiamento permite obter oócitos de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento ou até em atresia (HEWITT & ENGLAND, 1997a), porém o processo pode ser responsável pela baixa obtenção de oócitos de adequada qualidade (HEWITT et al., 1998).

Os oócitos obtidos, independente do processo de obtenção empregado, são classificados de acordo com o número de camadas de células da granulosa pelas quais o gameta está envolvido (DURRANT et al., 1998). Uma das funções das células do *cumulus* é transferir aporte nutricional ao oócito, mecanismo este de fundamental importância para a espécie canina, pois as células

do *cumulus* mantêm-se ligadas ao embrião até o estágio de mórula (NICKSON et al., 1993). A classificação dos complexos *cumulus*-oócitos (COC) se dá por três grupos distintos: Grau I – pigmentação escura, e com uma ou mais camadas de células do *cumulus*; Grau II – pigmentação clara, com camadas incompletas de células do *cumulus*; Grau III – coloração pálida, sem formato definido e ausência de células do *cumulus* aderidas, oócitos considerados degenerados (HEWITT & ENGLAND, 1997a).

Atualmente, existem diversos protocolos de maturação e fecundação *in vitro*, MIV e FIV respectivamente, porém pesquisas com a espécie canina utilizam adaptações mínimas quando comparadas às outras espécies (VANNUCCHI, 2003). Dentre os meios de maturação podem ser citados: o *tissue culture medium* 199 (TCM 199), suplementado com albumina sérica bovina (BSA), ou soro fetal bovino (SFB) sob diversas condições de temperatura e umidade (HEWITT & ENGLAND, 1999); o meio de solução de Krebs – Ringer bicarbonato modificado (TYH) (YAMADA et al., 1992); o meio tampão Tyrode modificado (TALP) (HAY et al., 1997); e o meio Briggers – Whitten – Whittingham (BWW) (BOLAMBA et al., 1998).

O meio TCM 199, além de modificado, pode ser suplementado com esteroides e outras substâncias favoráveis ao desenvolvimento oocitário, tais como SFB e BSA. O emprego dessas substâncias aumenta a sobrevivência dos oócitos em cultura, pois suporta a maturação e a consequente fecundação, na medida em que previne alterações desfavoráveis da zona pelúcida e favorece a aderência das células do *cumulus* ao oócito (HEWITT et al., 1998). Substâncias encontradas no líquido folicular e acrescidas ao meio de maturação como mucopolissacarídeos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, FSH, LH, andrógenos, estrógenos, inibina, ocitocina, vasopressina, fatores de crescimento como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), IGF-I e II desempenham um papel adjuvante, amplificador ou sinérgico dos fatores clássicos da maturação oocitária (FORTUNATO, 2005).

Estudos sugerem que o IGF-I induz a expansão das células do *cumulus*, melhorando, assim, sua taxa de maturação (SIROTKIN et al., 1998).

O grau de maturação nuclear oocitária é preconizado de acordo com o seguinte padrão:

- estágio de vesícula germinal (VG): núcleo vesicular com nucléolo distinto circundado por filamentos finos de cromatina;

- quebra de vesícula germinativa (QVG): reinício da meiose com algum grau de descondensação da cromatina e desaparecimento da vesícula nuclear. O nucléolo é corado fracamente e os cromossomos são facilmente visíveis (longos e finos) agrupados ao redor do nucléolo;

- estágio entre reinício da meiose e final da metáfase I (M I, A I, M II) – cromossomos enrolam-se, adquirem espessura menos delgada e não são mais distinguíveis, formando pares bivalentes de cromossomos:

- metáfase I (M I): formação de pares de cromossomos;

- anáfase I (A I): dois grupos de cromossomos (afastamento dos pares e movimentos em direções opostas à região equatorial);

- metáfase II (M II): grupos densos de cromossomos, formando o primeiro corpúsculo polar e outro grupo afastado permitindo a visualização individual dos cromossomos (HEWITT & ENGLAND, 1997b).

Já o padrão de maturação do citoplasma é realizado pela disposição dos grânulos citoplasmáticos (HYTTEL & MADSEN, 2000).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de 100ng/mL do fator de crescimento recombinante IGF-I, no meio TCM 199, na maturação *in vitro* de oócitos caninos.

MATERIAL E MÉTODOS

Submeteram-se cadelas de diferentes raças, com idades variando entre um e quatro anos, sem identificação da fase do ciclo estral, à ovariectomia pelo Serviço de Obstetrícia Veterinária da FCAV/Unesp. Os ovários foram acondicionados e transportados em solução de cloreto de sódio 0,9% a 38°C, sendo fatiados em solução aquecida de PBS + 10% de soro

fetal bovino (SFB), lavados e selecionados em meio TCM 199 HEPES, acrescido de sulfato de amicacina, solução de piruvato sódico (Sigma-Aldrich, P-4562) e SFB. Os COCs selecionados para maturação possuíam grau I e tamanho acima de 100µm, sendo alocados em placas de cultura tipo Nunc com quatro cavidades, contendo 500µL do meio de maturação TCM 199 acrescidos de sulfato de amicacina, piruvato sódico, SFB (50µL), FSH (0,5µL), LH (5µL) e estrógeno (0,5µL). Dividiram-se os COCs selecionados e lavados entre os grupos-controle (C) e tratamento (T). O meio de maturação do grupo T foi acrescido de 100ng/mL do fator de crescimento recombinante IGF-I (Sigma-Aldrich, I-127, MO, USA).

Após 72 horas, mantidos em estufa a 5% de CO₂ + 95% de umidade, os COCs foram colocados em solução de hialuronidase 0,2% por dez minutos para retirada das células do *cumulus* (aspirações repetidas). Colocaram-se os oócitos dos grupos C e T (n = 40) em solução de paraformaldeído 3% para avaliação da maturação nuclear com 10µg/mL de Hoeschst 33342 (Sigma-Aldrich, B-2261, MO, USA) conservado em glicerol + PBS, formando, assim, os grupos C (n) (controle – avaliação nuclear) e T (n) (tratamento – avaliação nuclear). Colocaram-se os oócitos desnudos (n = 136) em solução de proteinase (Sigma-Aldrich, P-1512, MO, USA) 0,5% por cinco minutos e, logo em seguida, em solução tiordes-ácida para remoção da zona pelúcida. Foram lavados, fixados em paraformaldeído 3% por trinta minutos e colocados em solução de bloqueio (PBS, BSA, glicina e ázida de sódio) por 24 horas em temperatura 4°C. Posteriormente, foram corados com 10µg/mL de isotiocianato de fluoresceína (*Lens culinaris*) (Sigma-Aldrich, L-9262, MO, USA) por vinte minutos para avaliação citoplasmática, sendo lavados em solução de bloqueio e corados com 10µg/mL de Hoeschst 33342 (Sigma-Aldrich, B-2261, MO, USA) conservado em glicerol + PBS para avaliação nuclear, formando, assim, o grupo C (c+n) e T (c+n). Colocados entre lâmina e lamínula, os oócitos corados foram avaliados sob microscópio epifluorescente filtro FITC: excitação 490nm e emissão 520nm.

Outros COCs (n= 82) foram selecionados para compor o grupo M0 (COCs corados no mesmo dia da colheita), para avaliação do seu grau de maturação nuclear no momento da colheita.

A análise estatística foi realizada por meio do teste de comparação de médias Kruskal-Wallis com nível de significância 5%.

RESULTADOS

Coletaram-se 534 COCs Grau I, provenientes de nove cadelas, que foram divididos nos grupo C e T e colocados no processo de maturação. Completaram o final da maturação e processo de coloração 176 oócitos, correspondendo a uma perda de 67,05% entre o início do processo de maturação até a confecção das lâminas.

O grupo M0 foi constituído por 82 oócitos que chegaram ao final do processo de coloração nuclear. A avaliação nuclear mostrou que 35 (42,68%) apresentaram-se em VG (Figura 1-A), vinte (24,39%), em QVG (Figura 1-B), sete (8,53%), em M I (Figura 1-C) e vinte (23,17%) em estado degenerativo ou não passível de identificação do material nuclear (Figura 1-D).

Houve uma frequência de 92,31% (n=72) dos oócitos do grupo C que apresentaram citoplasma imaturo (Figura 2-A) contra 7,69%

(n= 6) de oócitos com maturação citoplasmática evidente (Figura 2-B). Na avaliação nuclear, no grupo C(c+n), foram encontrados um (1,28%) oócito em VG, sete (8,97%) em QVG, quatro (5,12%) em M I, zero (0%) em M II e 66 (84,60%) degenerados ou não passíveis de identificação do material nuclear (Tabela 1). No grupo C (n), encontraram-se um (7,14%) oócito em VG, dois (14,28%) em QVG, um (7,14%) em M I, zero (0%) em M II e dez (71,42%) degenerados ou não passíveis de identificação do material nuclear (Tabela 1)

As amostras alocadas no grupo T apresentaram maturação citoplasmática em nove (18,36%) observações contra 49 (81,64%) oócitos imaturos dos 58 oócitos que fizeram parte deste grupo. Na avaliação nuclear do grupo T(c+n) houve observação de dois (3,44%) oócitos em VG, dois (3,44%) em QVG, cinco (8,62%) em M I, dois (3,44%) em M II e 47 (81,03%) degenerados ou não passíveis de identificação do material nuclear (Tabela 1). No grupo T(n), as frequências encontradas foram de zero (0%) oócitos em VG, seis (23,07%) em QVG, dois (7,69%) em M I, zero (0%) em M II e dezoito (69,23%) degenerados ou não passíveis de identificação do material nuclear (Tabela 1).

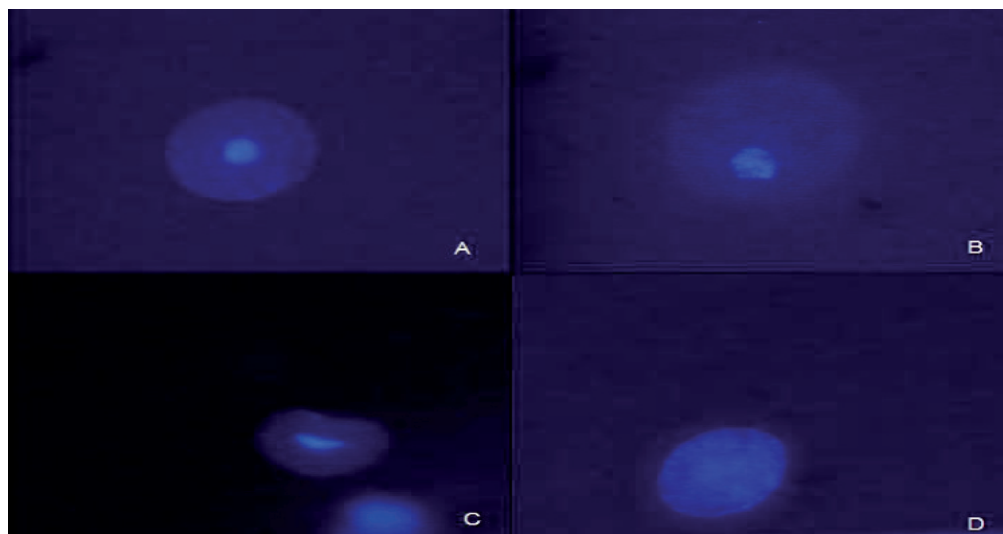


FIGURA 1. Fotomicrografia de oócitos caninos em estágio de vesícula germinativa (A), quebra de vesícula germinativa (B), anáfase I (C) e não passível de identificação nuclear (D).

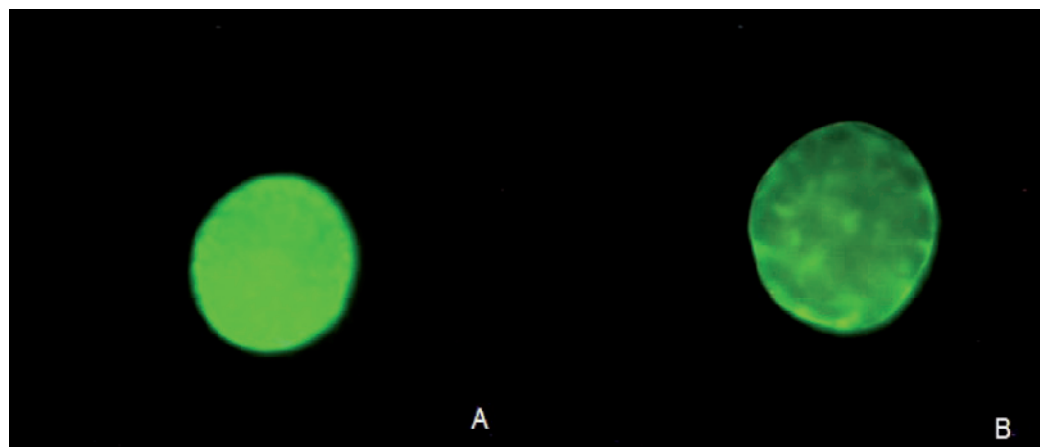


FIGURA 2. Fotomicrografia de oócitos caninos imaturos citoplasmaticamente (A) e citoplasma maturado evidenciando grânulos corticais na periferia (B).

TABELA 1. Número absoluto e porcentagem de oócitos de cadelas nas avaliações citoplasmáticas e nucleares, nos momentos M0 (momento de colheita) e após 72 horas de maturação *in vitro* nos grupos controle e tratamento (Jaboticabal, SP, 2006)

Avaliação citoplasmática		C (c + n)		T (c + n)	
Maturado (grânulos na periferia)		6/78 (7,69%)		9/58 (18,36%)	
Imaturo		72/78 (92,31%)		49/58 (81,64%)	
Avaliação nuclear	MO	C (c+n)	C(n)	T(c+n)	T(n)
VG	35/82 (42,68%)	1/78 (1,38%)	1/11 (7,11%)	2/58 (3,44%)	0/26 (0%)
QVG	20/82 (24,39%)	7/78 (8,97%)	2/14 (14,28%)	2/58 (3,44%)	6/26 (23,07%)
M I	7/82 (8,53%)	4/78 (5,12%)	1/14 (7,14%)	5/58 (8,62%)	2/26 (7,69%)
M II	0/82 (0%)	0/78 (0%)	0/14 (0%)	2/58 (3,44%)	0/26 (0%)
Degenerado	20/82 (23,17%)	66/78 (84,60%)	10/14 (71,42%)	47/58 (81,03%)	18/26 (69,23%)

* Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente com nível de significância 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

** VG (vesícula germinativa), QVG (quebra de vesícula germinativa), M I (metáfase I), M II (metáfase II).

DISCUSSÃO

A MIV é utilizada rotineiramente na biotecnologia da reprodução humana e em diferentes espécies de animais domésticos. Na espécie canina os resultados são bastante limitados tanto na maturação quanto na fertilização *in vitro* de embriões (YAMADA et al., 1992). O estudo da MIV e da FIV na espécie canina doméstica tem como principal motivo o estabelecimento de programas de preservação de gametas em canídeos com risco de extinção (HEWITT & ENGLAND, 1997a).

O TCM 199 foi inicialmente desenvolvido como meio de cultivo de diversos tecidos biológicos, porém suplementado com uma fonte

proteica (SFB, BSA, entre outros) e hormônios (FSH, LH, estrógeno) tem sido largamente utilizado, com resultados satisfatórios, como meio de maturação de gametas femininos em diferentes espécies domésticas, incluindo a canina (HEWITT & ENGLAND, 1999). Os bons resultados obtidos por diversos autores e a fácil aquisição do meio foram fatores determinantes para a utilização deste no presente estudo.

Estudos semelhantes a este, realizados por VANNUCCHI (2003) e PIRES (2006), revelaram uma taxa de perda oocitária no processo de maturação e coloração nuclear de 22,09% e 34,60%, respectivamente. A grande perda encontrada neste estudo (67,05%) pode ser justificada pelo fato de a maioria dos oócitos

analisados terem passado por dois processos de coloração: a citoplasmática e a nuclear. A avaliação citoplasmática requer 24 horas a mais de processamento (retirada da zona pelúcida, lavagens e permanência em solução de bloqueio) que a avaliação nuclear, o que deixa os oócitos mais frágeis e rompendo-se facilmente. Este fato pode ser corroborado pelos estudos de APPARÍCIO (2006), que também realizou as duas colorações e obteve uma perda de 49%.

Neste estudo não se encontraram diferenças estatísticas entre os grupos C e T com adição de 100ng/mL do fator de crescimento recombinante IGF-I, concordando com estudos realizados por GULER et al. (2000), que suplementaram o meio TCM 199 com IGF-I e não obtiveram melhora nas taxas de maturação citoplasmática ou nuclear em oócitos de ovelhas. Na MIV canina, o único relato de suplementação do fator de crescimento recombinante IGF-I ocorreu no meio de maturação SOF, em estudo realizado por MACHADO et al. (2007), que também não encontraram melhora nas taxas de maturação. Porém, discordando dos resultados deste estudo, em pesquisa semelhante com MIV de oócitos da espécie suína, no qual o meio de maturação TCM 199 foi suplementado com fatores de crescimento como IGF-I, IGF-II e EGF, separadamente, houve um acréscimo na taxa de maturação *in vitro* dos oócitos (SIROTKIN et al., 2000). A adição do fator de crescimento recombinante IGF-I, em diversos meios de maturação oocitária, foi testada em bovinos por LORENZO et al. (1994,1995), em coelhas por LORENZO et al. (1996) e YOSHIMURA et al. (1996), em bubalinos por KUMAR & PUROHIT (2004), em equinos por CARNEIRO et al. (2001) e em gatas por KITIYANANT et al. (2003), e em todas essas espécies os resultados obtidos mostraram uma melhora na taxa de maturação oocitária.

Mesmo não havendo diferenças estatísticas entre os grupos C e T, percentualmente, observou-se uma melhora no retorno à atividade meiótica dos oócitos do grupo T, já que apenas neste grupo foram observados oócitos em estágio M II.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados desta pesquisa, pode-se concluir que o acréscimo de 100ng/mL do fator de crescimento recombinante IGF-I, na maturação *in vitro* de oócitos caninos, em meio TCM 199, não resultou em melhora na taxa de maturação. Porém esses resultados sugerem a necessidade de novas pesquisas com diferentes diluições do fator de crescimento e acréscimo de novos componentes ao meio TCM 199.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp, pelo financiamento do projeto, e ao Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Campus de Jaboticabal.

REFERÊNCIAS

- APPARÍCIO, M. F. **Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos de cadelas (*Canis familiares*) obtidos por ovariectomia-histerectomia.** 2006, 61 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006.
- BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K. D.; DURRANT, B. S. *In vitro* maturation of domestic dog oocytes cultures in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 933-942, 1998.
- CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C. PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 899-905, 2001.
- CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 3-25, 1989. Supplement 39.
- 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.

- FORTUNATO, J. S. **Fisiologia da reprodução**. 2005. Disponível em: <fisiologia.med.up.pt/textos_Apoio/fisiolRepro.doc>. Acesso em: 2 mar. 2006.
- GUÉRIN, C. Fécondation *in vitro* chez la chienne. Où en est-on? **Pratique Médicale et Chirurgicale des Animaux de Compagnie**, v. 33, n. 2, p. 155-161, 1998.
- GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, P.; TERQUI, M.; COGNIÉ, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v. 54, n. 2, p. 209-218, 2000.
- HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTHEY, C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Canine spermatozoa: cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1329-1342, 1997.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoa performance *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 50, n. 1/2, p. 123-139, 1997a.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 83-91, 1997b. Supplement 51.
- HEWITT, D. A.; WATSON, P. F.; ENGLAND, G. C. W. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 6, p. 1083-1101, 1998.
- HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 55, n. 1, p. 63-75, 1999.
- HYTTEL, P.; MADSEN, I. Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 60-61, n. 2, p. 389-403, 2000.
- 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, n. 8, p. 1775-1786, 2003.
- KUMAR, D.; PUROHIT, G.N. Effect of epidermal and insulin-like growth factor-I on *cumulus* expansion, nuclear maturation and fertilization of buffalo *cumulus* oocyte complexes. **Veterinarski Arhiv**, v. 74, n. 1, p. 13-25, 2004.
- LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C. ILLERA, M. Enhancement of *cumulus* expansion and nuclear maturation during bovine oocyte IVM with addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 3, p. 697-701, 1994.
- LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M. Role of EGF, IGF-I, Sera and *cumulus* cells on maturation *in vitro* of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 44, n. 1, p. 109-118, 1995.
- LORENZO, P. L.; REBOLLAR, P. G.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M.; ALVARINO, J. M. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, n. 1, p. 109-117, 1996.
- MACHADO, M. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, K. Influência do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) adicionado ao meio fluido sintético de tuba uterina (SOF) sobre a maturação *in vitro* de oócitos caninos (*Canis familiaris*). **Semina (Ciências Agrárias)**, v. 28, n. 3, p. 455-464, 2007.
- NICKSON, D. A.; BOYD, J. S.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J. M.; HARVEY, M. J.; RENTON, J. P. Molecular biology methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 231-240, 1993. Supplement 47.
- OTOI, T.; FUJI, M.; TANAKA, M.; OOKA, A.; SUZUKI, T. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 535-542, 2000.
- PIRES, E. A. **Efeito da suplementação de cisteína e cisteamina sobre a maturação nuclear de oócitos de fêmeas caninas (*Canis familiaris*) obtidos por ovariossalpingo-histerectomia durante a fase pré-ovulatória do estro**. 2006, 66 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- SAINT-DIZIER, M.; RENARD, J. P.; CHASTANT-MAILLARD, S. Induction to final maturation by sperm penetration in canine oocyte. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 97-105, 2001.
- 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, n. 6, p. 559-569, 2000.

- SIROTKIN, A. V.; TARADAJNIK, T. E.; MAKAREVICH, A. V.; BULLA, J. Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 51, n. 4, p. 333-344. 1998.
- TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 269-275, 1989. Supplement 39.
- VANNUCCHI, C. I. **Estudo da maturação nuclear *in vitro* de oócitos de cães em mios suplementados com hormônios e co-cultivo em células homólogas da tuba uterina**. 2003, 77 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.
- YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H.; NAKAZAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Maturation, fertilization and development of dog oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 5, p. 853-858, 1992.
- YOSHIMURA, Y.; ANDO, M.; NAGAMATSU, S.; IWASHITA, M.; ADACHI, T.; SUEOKA, K.; MIYAZAKI, T.; KUJI, N.; TANAKA, M. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 1, p. 152-160, 1996.

Protocolado em: 3 abr. 2007. Aceito em: 17 fev. 2009.