

EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF) DURANTE LA MADURACIÓN DE OOCITOS SOBRE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS

Effect of Epidermal Growth Factor (EGF) During Oocyte Maturation on *in vitro* Production of Bovine Embryos

Roberto Palomares-Naveda¹, Hugo Hernández-Fonseca^{1,2}, Eleazar Soto-Belloso^{1,3}, Rumualdo González-Fernández^{1,3}, Aitor De Ondiz-Sánchez¹, Fernando Perea-Ganchou¹, Saksiri Sirisathian² y Benjamín Brackett²

¹Unidad de Investigación en Reproducción Animal (UNIRA). Facultad de Ciencias Veterinarias. La Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. ²University of Georgia, Department of Physiology and Pharmacology. Athens-Georgia. U.S.A. ³Venezolana de Inseminación Artificial y Transplante de Embriones (VIATECA), Villa del Rosario, Zulia-Venezuela. E-mail: hjhernan@cantv.net

RESUMEN

El objetivo de este experimento fue investigar el efecto del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), durante la maduración *in vitro* (MIV) de oocitos bovinos, sobre el desarrollo embrionario *in vitro*. Los oocitos fueron obtenidos por aspiración de ovarios provenientes de vacas de matadero. Se seleccionaron 163 complejos oocitos-cumulus (COC's), con tres o más capas de células de la granulosa y fueron incubados durante 24 horas en medios de maduración ovocitaria (OMM) químicamente definidos, con los siguientes tratamientos: 1) OMM modificado (T₁); 2) OMM modificado suplementado con 10 ng/ml de EGF (T₂); 3) OMM modificado suplementado con suero fetal bovino al 10% (T₃). Luego de la MIV, en cada medio, los oocitos fueron incubados con espermatozoides (2 x 10⁶/ml), durante 18 horas. Los oocitos fecundados fueron desnudados y cultivados *in vitro* hasta el estadio de blastocistos. Los oocitos madurados en T₂ y T₃ presentaron una tasa de división similar, pero significativamente mayor que los madurados en T₁ (P<0,05). La tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto fue similar en los oocitos madurados en T₂ y T₃. Los oocitos madurados en T₃ mostraron una mayor tasa de desarrollo hasta blastocisto en comparación con T₁ (P<0,01). EGF en medios químicamente definidos induce una tasa de división y desarrollo hasta blastocisto similar a la obtenida con suero fetal bovino al 10%, representando una alternativa en la maduración de oocitos para la producción *in vitro* de embriones bovinos.

Palabras clave: Epidermal growth factor, fecundación *in vitro*, maduración de oocitos, bovinos.

ABSTRACT

The aim of this experiment was to research the effect of Epidermal Growth Factor (EGF) during *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes on the development of bovine embryos *in vitro*. The oocytes were recovered from ovaries of slaughtered cows. An IVM media containing serum was compared with chemically defined medias. As a result, 163 Cumulus oocyte complexed (COC's) were selected, with three or more layers of granulosa cells, and were incubated for 24 hours in one of the three maturation medias: 1) Modified OMM (T₁); 2) Modified OMM supplemented with 10 ng/ml of EGF (T₂); 3) Modified OMM supplemented with 10% of fetal bovine serum (T₃). Following IVM, COC's were inseminated with 2x10⁶ spermatozoa / ml. After 18 hours of gamete coincubation, presumptive zygotes were denuded and placed in culture until the blastocyst stage. Cleavage rates were similar in T₂ and T₃, but significantly greater than in T₁ (P<0.05). Addition of EGF during *in vitro* maturation (T₂) did not yield more blastocyst compared to the other treatments. None the less, T₃ (with serum) had a greater yield of blastocysts compared with T₁ (P<0.01). Results in this study show that the addition of EGF to chemically defined media produces similar cleavage rates and blastocyst yields to those obtained when using serum during IVM, representing an alternative for *in vitro* production of bovine embryos.

Key words: Epidermal growth factor, *in vitro* fertilization, maturation of oocytes, bovine.

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* representa una alternativa dentro de las estrategias para el mejoramiento repro-

ductivo y genético en la ganadería bovina [5]. Distintos medios de cultivo con bicarbonato o HEPES y suplementados con suero fetal bovino, gonadotropinas y/o hormonas esteroidales, han sido ampliamente usados para estudiar la maduración *in vitro* [5, 15]. Las condiciones de cultivo durante la maduración *in vitro* (MIV) de oocitos bovinos pueden influir significativamente sobre la tasa de fecundación *in vitro* y el subsecuente desarrollo embrionario [26].

Los oocitos bovinos inmaduros recuperados de folículos con un diámetro menor a los 6 mm son capaces de reanudar la meiosis (maduración nuclear) en ausencia de suero [34]; sin embargo, la tasa de fecundación y el desarrollo embrionario es mayor cuando el medio de maduración contiene suero [19, 37]. Los medios químicamente definidos, han sido utilizados para determinar el efecto de la FSH y de los factores de crecimiento sobre la MIV de oocitos bovinos [13, 17] y en la caracterización bioquímica de los efectos hormonales sobre el metabolismo del oocito durante la MIV [38]. Los medios no definidos (conteniendo suero, albúmina u otros productos de origen biológico) obstaculizan la medición de los efectos de diversos factores sobre el desarrollo embrionario *in vitro* debido a la presencia de agentes desconocidos en estos productos biológicos. Además, estos medios no son recomendables para ser utilizados debido al temor de que contengan contaminantes y agentes infecciosos [6].

Algunos factores de crecimiento y citoquinas, actúan como reguladores intraováricos *in vivo* [2, 10]. A nivel folicular, la acción de las gonadotropinas es modulada por factores de crecimiento producidos localmente que actúan en forma autocrina y paracrina [4]. EGF ha sido encontrado en folículos preantrales y antrales pequeños de hámster [11]. Este factor de crecimiento estimula la síntesis de ADN y la proliferación de células de la granulosa en la cerda e inhibe su diferenciación [22], también acorta el tiempo requerido para la ruptura de la vesícula germinal, promoviendo la reanudación de la meiosis.

Ha sido reportado que las células del cúmulus y de la granulosa tienen receptores para EGF [7, 29, 32, 35] e IGF-I [30, 31]. EGF intrafolicular puede actuar como un factor proliferante sobre las células de la granulosa [3] y el IGF-I es uno de los factores de crecimiento más importantes en la fisiología ovárica para el control de la folículoogénesis *in vivo* [23], la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa *in vitro* [2].

Estos factores de crecimiento están presentes no solo en el fluido folicular sino también en el suero, el cual contiene muchos otros factores de crecimiento. De tal manera que el efecto de los factores de crecimiento debe ser probado en sistemas de cultivo libres de suero. Trabajos previos han sugerido una influencia positiva de EGF durante la MIV de oocitos bovinos sobre la tasa de división post-fecundación y el subsecuente desarrollo embrionario [12].

Harper y Brackett [14] concluyeron que la combinación de EGF con bajas concentraciones de gonadotropinas durante la MIV de oocitos bovinos rodeados por células del cúmulus,

mejoró el desarrollo hasta blastocistos, mientras que EGF en ausencia de gonadotropinas no logró mejorar el porcentaje de oocitos que alcanzaron la maduración nuclear. Además, otros investigadores han reportado que la suplementación con EGF en el medio de maduración, mejora la capacidad de desarrollo de oocitos bovinos después de la fecundación [18, 20]. Adicionalmente, ha sido observado que la presencia de IGF-I en el medio de MIV incrementa el número de mórulas y blastocistos [16]. Medios de maduración de oocitos conteniendo IGF-I y/o EGF estimulan la expansión del cúmulus y promueven la maduración nuclear *in vitro* de oocitos bovinos rodeados por células del cúmulus [21, 25, 27, 28].

Los objetivos del presente experimento fueron:

1. Determinar el efecto del EGF en medios químicamente definidos conteniendo IGF-I y FSH durante la MIV de oocitos bovinos sobre la tasa de división y desarrollo hasta blastocistos.
2. Comparar las tasas de división y desarrollo hasta blastocistos, de oocitos madurados en medios químicamente definidos, suplementado con EGF, y en medios conteniendo suero fetal bovino al 10%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de ovarios

Los ovarios fueron obtenidos en un matadero en Carolina del Sur-E.U.A., y fueron transportados al laboratorio (Georgia-E.U.A) por vía aérea, con un intervalo de tiempo de aproximadamente 2 horas hasta su llegada, mantenidos a temperatura ambiente, hasta su aspiración. Al llegar al laboratorio los ovarios fueron lavados con agua a una temperatura de 37°C para remover la sangre y otros residuos.

Aspiración folicular y selección de oocitos:

Sólo se aspiraron folículos claros y transparentes entre 2 y 5 mm de diámetro con agujas de 18 g acopladas a jeringas de 10 ml. El fluido folicular conteniendo los COC's fue inmediatamente colocado en envases de plástico de 50 ml, protegidos de la luz. Este procedimiento fue llevado a cabo a 25-27°C durante 2 horas aproximadamente. La subsiguiente manipulación de los COC's fue realizada a 38,5°C. El recipiente conteniendo el fluido folicular fue mantenido verticalmente durante 15 minutos para concentrar los COC's en el fondo del mismo por efecto de gravedad. Luego se tomó 1 ml del fondo del tubo, y se colocó en una placa de petri cuadrada con 5 cc de OMM, para realizar la búsqueda de los COC's. Únicamente fueron seleccionados aquellos COC's que presentaban un citoplasma homogéneo y cubiertos por tres o más capas de células del cúmulus [36].

Maduración *in vitro*

El medio base para este experimento fue el medio de maduración de oocitos (OMM), químicamente definido, conte-

niendo 9,8 mg/ml de TCM199 (SIGMA-E.U.A.); 1,0 mg/ml de alcohol polivinílico; 2,38 mg/ml HEPES (10 mM); 0,05 mg/ml de piruvato de sodio; 0,05 µg/ml de sulfato de gentamicina; 0,1 mM de cisteamina; 0,25 mM de L-cisteína; 0,036 mg/ml de L-glutamina y 2,2 mg/ml de bicarbonato de sodio. Adicionalmente el OMM contenía hormona folículo estimulante (FSH, 1 U.I/ml) e IGF-I (5 ng/ml). El OMM poseía una osmolaridad entre 280 y 300 mOsm/L y fue ajustado a un pH de 7,25.

Los COC´s fueron asignados aleatoriamente a los siguientes tratamientos aplicados durante la MIV: T₁ (n=72): OMM modificado; T₂ (n=45): OMM modificado suplementado con EGF (10 ng/ml) ó T₃ (n=46): OMM suplementado con suero fetal bovino al 10%. Los COC´s fueron colocados en grupos de 15 a 20 en cada gota de 100 µl de OMM conteniendo los tratamientos mencionados anteriormente. La incubación para MIV fue llevada a cabo bajo aceite de parafina filtrado, en una atmósfera controlada a 38,5°C, saturada de humedad, protegidas de la luz y bajo 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂, durante 24 horas [15].

Preselección y capacitación espermática

Los espermatozoides vivos fueron seleccionados mediante la técnica de *swim-up* [24]. Para llevar a cabo esta técnica fueron utilizados tubos de plástico de 3 ml conteniendo 1,5 ml de medio definido modificado (mDM) con cafeína (1 mg/ml) a cada uno de los cuales se adicionó en el fondo 110 µl de semen de un toro raza Brahman, de fertilidad comprobada e incubados durante 45 minutos, en ángulo de 45° en la atmósfera mencionada anteriormente.

Después del *swim-up*, fueron tomados 850 µl del medio sobrenadante que cubría el pellet de semen de cada uno de los tubos y colocados en un tubo de plástico de 10 ml para ser centrifugados durante 10 minutos a 320 g. Los espermatozoides contenidos en el pellet del fondo del tubo fueron capacitados usando 200 µg/ml de heparina y colocados en incubación durante 15 minutos.

Fecundación y cultivo *in vitro*

La fecundación fue llevada a cabo colocando una dosis de 200.000 espermatozoides móviles por gota de 100 µl (2x10⁶ espermatozoides/ml) de mDM sin cafeína, conteniendo 20 COC´s durante 18 horas. Posterior a la fecundación, los COC´s (presuntos cigotos) fueron desnudados (separación de las células del cúmulus) y colocados en medio de fluido oviductal sintético rico en glutamina (g-SOF), pero carente de glucosa y citrato, durante los primeros 3 días de incubación. La tasa de división evaluada a las 72 horas (día 3 post-inseminación), fue definida como número de embriones que alcanzaron el estadio de 4 o más células del total de COC´s puestos a fecundar, expresada en porcentaje. Posteriormente dichos embriones fueron incubados durante 72 horas (del día 4 al 6 post-inseminación) en un medio de fluido oviductal sintético rico en citrato y glucosa (c-SOF), pero sin glutamina. Final-

mente los embriones fueron cultivados en OMM (días 7-8) para evaluar la tasa de desarrollo hasta blastocisto, definida como el número de blastocistos obtenidos en base al número total de COC´s sometidos a la fecundación, expresada en porcentaje.

Los datos fueron analizados usando PROC WEIGHT y la prueba de Chi-cuadrado del paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS), versión 6.03 [33].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I se presenta el efecto de los factores de crecimiento sobre la tasa de división. Los COC´s madurados en OMM modificado, suplementado con EGF (T₂), presentaron similar tasa de división que los madurados en OMM modificado más suero fetal bovino al 10% (T₃), pero significativamente mayor a la presentada por los oocitos madurados en medios químicamente definidos en ausencia de EGF (T₁) (P<0,05).

La tasa de desarrollo hasta blastocisto fue significativamente inferior en los oocitos madurados en T₁ en comparación con aquellos madurados en medio conteniendo suero fetal bovino al 10%. La suplementación del medio de maduración con EGF (T₂) mejoró la tasa de desarrollo hasta blastocisto, siendo similar a la encontrada en el suero (T₃), (TABLA II).

Similares hallazgos han sido reportados por Abeydeera y col. [1], quienes incubaron (MIV) oocitos porcinos en TCM199; TCM199+EGF y Medio de Fluido Folículo (FF) al 10%, encontrando diferencias significativas en cuanto a la tasa de fecundación (P<0,01) entre los tres medios, con valores de 52, 60 y 69%, respectivamente. Los oocitos madurados en TCM199 sin EGF presentaron la más baja tasa de desarrollo hasta blastocisto (22%), siendo similar entre los grupos TCM+EGF y Fluido folículo al 10% (37%). Los blastocistos presentaron un mayor número de células cuando los oocitos fueron madurados en TCM+ EGF (P<0,01), indicando que el EGF incrementa la capacidad de desarrollo de los oocitos porcinos madurados en un medio de cultivo libre de proteína.

Un estudio realizado por Sakaguchi y col. [27] reveló que la maduración de oocitos en medios suplementados con facto-

TABLA I
EFFECTO DE EGF Y SUERO DURANTE LA MADURACIÓN
IN VITRO DE OOCITOS BOVINOS SOBRE LA TASA
DE DIVISIÓN

Tratamientos	COC´s n	Tasa de división	
		n	%
T ₁	72	18	25,0 ^a
T ₂	45	19	42,2 ^b
T ₃	46	21	45,7 ^b

^{a,b} valores en columnas con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05).

TABLA II
EFFECTO DE EGF Y SUERO DURANTE LA MADURACIÓN
IN VITRO DE OOCITOS BOVINOS SOBRE LA TASA DE
DESARROLLO EMBRIONARIO HASTA BLASTOCISTOS

Tratamientos	COC's	Tasa de desarrollo blastocisto	
	n	n	%
T ₁	57	6	10,5 ^a
T ₂	45	11	24,4 ^{ab}
T ₃	29	10	34,5 ^b

^{a,b} valores en columnas con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,01).

res de crecimiento IGF-I y EGF aceleró la progresión de la meiosis y cuando fueron fecundados solo aquellos oocitos con extrusión del primer cuerpo polar, no fue afectada la tasa de fecundación y subsecuente desarrollo hasta blastocisto. Es decir, la tasa de división embrionaria y el desarrollo hasta blastocistos de los oocitos con el primer cuerpo polar extrusionado (únicos sometidos a la fecundación) no fue afectada por los tratamientos con factores de crecimiento en el medio de maduración. Estos resultados difieren de los encontrados en el presente estudio, posiblemente debido a que en este experimento fueron sometidos a la fecundación todos los oocitos (aparentemente madurados con expansión de las células del cúmulus) independientemente de la extrusión o no del primer cuerpo polar (maduración nuclear).

Otros investigadores han reportado que la suplementación con EGF en el medio de maduración mejoró la capacidad de desarrollo de oocitos bovinos después de la fecundación [18, 20]. Harper y Brackett observaron que la combinación de EGF con bajas concentraciones de gonadotropinas durante la maduración *in vitro* de oocitos bovinos rodeados por células del cúmulus, mejoró el desarrollo hasta blastocisto [14]. Grazul-Bilska y col. [8] trabajando con oocitos ovinos madurados con o sin EGF, en presencia de suero, encontraron que EGF incremento el numero de blastocistos. Aun cuando no fueron encontradas diferencias entre ambos grupos en la tasa de fecundación. Estos resultados apoyan la tesis de otros autores [8, 9] que afirman que factores tales como EGF adicionados a los medios de maduración optimizan las condiciones de maduración y la formación de blastocistos.

CONCLUSIONES

EGF en medios químicamente definidos produce una tasa de división y desarrollo hasta blastocisto similar a la obtenida con suero fetal bovino al 10%, representando una alternativa en la maduración de oocitos para la producción *in vitro* de embriones bovinos. Son requeridos más estudios sobre el efecto de los factores de crecimiento en la producción *in vitro* de embriones para aclarar los mecanismos mediante los cuales estos mejoran el desarrollo embrionario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABEYDEERA, L. R.; WANG, W. H.; CANTLEY, T. C.; REIKE, A.; MURPHY, C. N.; PRATHER R. S.; DAY B. N. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. **Theriogenol** 54: 787-797. 2000.
- [2] ADASHI, E. Y.; RENSICK, C. E.; D'ERCOLE, A. J.; SVOBODA, M. E.; VAN WYK, J. J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. **Endocr. Rev.** 6: 400-420. 1985.
- [3] BENDELL, J. J.; DORRINGTON, J. H. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. **Endocrinol.** 127: 533-540. 1990.
- [4] BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenol.** 47:13-22. 1997.
- [5] BRACKETT, B.; ZUELKE, K. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenol.** 39: 43-64. 1993.
- [6] BRACKETT, B. G. Chemically defined media for embryo production (IVMFC). **Proceedings of the American Embryo Transfer Association**, 16th Annual Convention, Madison, WI, 18-35 pp. 1997.
- [7] FENG, P.; KNECHT, M.; CATT, K. J. Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. **Endocrinol.** 120: 1121-1126. 1987.
- [8] GRAZUL-BILSKA, AT.; CHOI, J.T.; BILSKI, J.J.; WEIGL, R.M.; KIRSCH, J.D.; KRAFT, K.C.; REINOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after *in vitro* fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. **Theriogenol.** 59: 1449-1457. 2003.
- [9] GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, P.; TERQUI, N.; COGNIÉ, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Theriogenol.** 54: 209-218. 2000.
- [10] GREEWALD, G. S.; ROY, S. K. Follicular development and its control. In: **The Physiology of Reproduction**, Knobil E, Neill JD (Eds). New York: Raven Press. 629-724 pp. 1994.
- [11] HAMMOND, J. M.; HSU, C. J.; MONDSCHHEIN, J. S.; CANNING, S. F. Paracrine and autocrine functions of growth factors in the ovarian follicle. **J. Anim. Sci.** 66 (Suppl 2): 21-31. 1988.
- [12] HARPER, K. M.; BRACKETT, B. G. Effect of gonadotropins with epidermal growth factor (EGF) during maturation on embryo viability *in vitro*. **Biol Reprod.** 44 (suppl1): 85 (abstract 132). 1991.

- [13] HARPER, K. M.; KAYE, P. Enhanced bovine oocyte quality after *in vitro* maturation IVM with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. **Biology Reprod and Develop** Supplement 1: 67 (Abstract) 1992.
- [14] HARPER, K.; BRACKETT, B. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. **Biol. Reprod.** 48: 409-416. 1993.
- [15] HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; SIRISATHIEN, S.; BOSCH, P.; CHO, H.S.; LOTT, J.D.; HAWKINS, L.L.; HOLLETT, R.B.; COLEY, S.L.; BRACKETT, B.G. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced *in vitro* in chemically defined media. **Anim Reprod Sci.** 69: 151-158. 2002.
- [16] HERRLER, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMAN, H. Effects of insulin-like growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenol.** 37: 1213-1224. 1992.
- [17] KENKISTEPE, L.; BURNLEY, C.; BRACKETT, B. Production of viable bovine blastocyst in defined *in vitro* conditions. **Biol. Reprod.** 52: 1410-1417. 1995.
- [18] KOBAYASHI, K.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. **J. Reprod Fertil.** 100: 439-446. 1994.
- [19] LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRISTER, E. S.; EYESTONE, W. H.; NORTHEY, D. L.; FIRST, N. L. Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Theriogenol.** 25: 164. 1986.
- [20] LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation on preimplantation embryo development *in vitro*. **Biol Reprod.** 54: 1420-1429. 1996.
- [21] LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, M. Enhancement of cumulus expansion on nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I. **J. Reprod Fertil.** 101: 697-701. 1994.
- [22] MAY, J. V.; FROST, J. P.; SHOMBERG, D. W. Differential effects of epidermal growth factor, Somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and Transforming growth factor-beta on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. **Endocrinol.** 123: 168-179. 1988.
- [23] MONGET, P.; MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. **Reprod Fertil.** suppl 49:321-333. 1995.
- [24] PARRISH, J. J.; PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of swimup separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Biol. Reprod.** 30 (Supp. 1): 112 Abstr. 1984.
- [25] RIEGER, D.; LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; POCAR, P.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. The effects of epidermal growth factor and Insulin-like growth factor I on the metabolic activity nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. **Reprod Fertil.** 112: 123-130. 1998.
- [26] ROSE, T.A.; BAVISTER, B. D. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. **Mol Reprod. Dev.** 31: 72-77. 1992.
- [27] SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; AND FIRST, N. L. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes *in vitro* and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. **Theriogenol.** 54: 1327-1342. 2000.
- [28] SAKAGUCHI, M.; DOMINKO, T.; YAMAUCHI, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NAGAI, T.; AND FIRST, N. L. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*. **Reprod.** 123: 135-142. 2002.
- [29] SINGH, B.; RUTLEDGE, J. M.; ARMSTRONG, D. T. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. **Mol Reprod Dev.** 40: 391-399. 1995.
- [30] SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; VERNON, R. K. Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: Effect of follicle size and hormones. **Mol Cell Endocrin.** 102: 69-76. 1994.
- [31] SPICER, L. J.; STEWART, R. E. Interaction among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: Role of IGF-I receptors. **Biol. Reprod.** 54: 255-263. 1996.
- [32] ST-ARNAUD, R.; WALKER, P.; KELLY, P. A.; LA BRIE, F. Rat ovarian epidermal growth factor receptors: Characterization and hormonal regulation. **Mol Cell Endocrin.** 31: 43-52. 1983.
- [33] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS User guide.** Version 6,12 Cary, NC., USA. 584 pp. 1991.
- [34] SUSS, U.; WUTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division on bovine oocytes matured *in vitro*. **Biol. Reprod.** 38: 871-880. 1988.
- [35] WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol Reprod.** 47: 807-813. 1992.

- [36] YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYRER-HOSKEN, R. A. 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Gamete Res.** 23: 189-201. 1989.
- [37] ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biol Reprod.** 43: 784-787. 1990.
- [38] ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. Effect of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured *in vitro*. **Endocrinol.** 131: 2690-2696. 1992.