

FAMÍLIA FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL E SEU PAPEL NA FUNÇÃO OVARIANA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

[*Epidermal growth factor family and its role in ovarian function and embryonic development*]

Cleudson Manoel Gomes da Silva*, **Luciana Rocha Faustino**, **Juliana Jales de Hollanda Celestino**, **Ana Paula Ribeiro Rodrigues**, **José Ricardo de Figueiredo**

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais - LAMOFOPA, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO - Diversos processos celulares, tais como a sobrevivência, proliferação, diferenciação, adesão e migração celular, são controlados por uma variedade de fatores de crescimento. Dentre estes fatores destaca-se a família do fator de crescimento epidermal (EGF), que é constituída de pelo menos oito membros, descritos como importantes mediadores da função ovariana. Sua ação no desenvolvimento folicular e embrionário é mediada por receptores transmembranários do tipo tirosina quinase, capazes de interagir com pelo menos seis diferentes membros desta família. O presente trabalho tem como objetivo abordar o papel da família EGF no desenvolvimento folicular e embrionário em mamíferos.

Palavras-Chave: EGF, receptor tirosina quinase, folículo ovariano.

ABSTRACT - Several cellular processes, such as cell survival, proliferation, differentiation, adhesion and migration, are controlled by a variety of growth factors. Among these factors it is possible to highlight the epidermal growth factor (EGF) family, which is constituted of at least eight members, described as important mediators of ovarian function. Its action on the follicular and embryo development is mediated by tyrosine kinase transmembrane receptors that are able to interact with at least six different members of this family. This paper aims focus on the role of EGF family on follicular and embryonic development in mammals.

Keywords: EGF, tyrosine kinases receptor, ovarian follicle.

INTRODUÇÃO

A maioria dos eventos biológicos relacionados à fisiologia ovariana em mamíferos, como a proliferação das células da granulosa, a esteroidogênese e a maturação do oócito, é influenciada por diversos fatores de crescimento (Van den Hurk & Zhao, 2005), incluindo aqueles pertencentes à família do fator de crescimento epidermal (EGF) (Riese & Stern, 1998; Silva et al., 2006). A família EGF é composta por vários membros, a saber: o fator de crescimento transformante- α (TGF- α), o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina (HB-EGF), a anfiregulina (AR), a epiregulina (EPR), a betacelulina (BTC) e as neuregulinas (NRG1-4) (Park et al., 2004; Conti et al., 2006). A atividade biológica dos membros desta família é mediada por receptores do tipo tirosina quinase, localizados na superfície da membrana plasmática, responsáveis por iniciar e manter uma complexa rede de eventos que

controlam o crescimento e a diferenciação celular (Lafky et al., 2008).

No folículo ovariano, o EGF estimula a mitose nas células foliculares (granulosa/teca) (Celestino et al., 2009), induz o crescimento do oócito (Gall et al., 2004), mantém a viabilidade folicular (Celestino et al., 2009), favorece a produção de esteróides (Jamnongjit et al., 2005), promove a expansão das células do cumulus (Bolamba et al., 2006) e ainda exerce um papel determinante na maturação nuclear oocitária (Farin et al., 2007; Hatoya et al., 2008) e citoplasmática (Merlo et al., 2005; Rossi et al., 2006). Além disso, possui um importante papel no desenvolvimento embrionário inicial (Klonisch et al., 2001). Diante das fortes evidências do papel do EGF e dos demais membros de sua família no controle da foliculogênese ovariana, o presente trabalho tem como objetivo abordar o papel da família EGF no desenvolvimento folicular e embrionário em mamíferos.

* Autor para correspondência. E-mail: gomesvet@hotmail.com.

FATORES DE CRESCIMENTO PERTENCENTES À FAMÍLIA EGF

A maioria dos fatores de crescimento possui precursores solúveis que são biologicamente inertes, cuja existência se limita aos compartimentos citoplasmáticos onde o processamento de proteínas secretoras normalmente ocorre (Singh & Harris, 2005). Por outro lado, alguns fatores de crescimento, como os membros da família EGF, são sintetizados como proteínas ancoradas à membrana celular (Massague & Pandiella, 1993). Estudos têm demonstrado que mesmo ligados a membrana celular, momento em que são denominados de pró-fatores, estas proteínas já podem produzir sinais mitogênicos, através do contato célula-célula (Iwamoto & Mekada, 2000). Contudo, o principal estímulo mitogênico induzido por estes fatores ocorre quando estas proteínas estão livres e biologicamente ativas (Massague & Pandiella, 1993).

As informações a respeito dos precursores dos membros da família EGF são escassas, no entanto, sabe-se que precursores proEGF, são glicoproteínas que pesam entre 140 e 170 kDa. Quando expressos, os proEGF são normalmente liberados dentro de poucas horas no espaço extracelular por clivagem proteolítica no domínio C-terminal do EGF, gerando um fragmento solúvel similar ao tamanho do seu precursor (Massague & Pandiella, 1993). Os mecanismos moleculares responsáveis por ativar os proEGF ainda não estão completamente elucidados. Contudo, algumas metaloproteínas dependentes de zinco têm sido implicadas neste processo (Sanderson et al., 2006).

A família de fatores de crescimento semelhante ao EGF é constituída pelos ligantes EGF, AR, TGF- α , BTC, HB-EGF, EPR e ainda pelas neuroregulinas 1, 2, 3 e 4 (NRG1-4). Esses ligantes possuem em comum um domínio de 45-55 aminoácidos incluindo seis resíduos de cisteína que interagem covalentemente formando três alças, responsáveis pela especificidade de ligação aos respectivos receptores (Casalini et al., 2004).

FAMÍLIA DE RECEPTORES EGFR/ERBB

Os fatores de crescimento da família EGF podem se ligar a diferentes tipos de receptores transmembranários conforme mostrado na Figura 1. A molécula do receptor de EGF é uma glicoproteína

de 170 kDa (Herbst, 2004), cujo gene está localizado no braço curto do cromossomo 7 (Davies et al., 1980). Atualmente, os receptores dos membros da família EGF são conhecidos como EGFR/ERBB, sendo constituído por quatro representantes: (a) EGFR/ERBB1/HER1; (b) ERBB2/HER2/NEU; (c) ERBB3/HER3 e (d) ERBB4/HER4. Estes receptores são do tipo tirosina quinase e possuem um domínio transmembranário que separa a região tirosina quinase intracelular da porção extracelular, onde ocorre a ligação do ligante ao receptor (Roskoski, 2004), também mostrado na Figura 1.

A região extracelular é composta por quatro domínios (I-IV) com alta homologia estrutural (Warren & Landgraf, 2006). Os domínios I e III são ricos em leucina e são importantes para a ligação dos fatores de crescimento, enquanto os domínios II e IV são ricos em cisteínas. O domínio II é responsável pela dimerização dos receptores EGFR/ERBB (Citri & Yarden, 2006), que pode ocorrer entre receptores iguais (homodímeros) como, por exemplo, ERBB1/ERBB1 ou entre receptores diferentes (heterodímeros) como, por exemplo, ERBB1/ERBB2, tendo como consequência a internalização do receptor (Citri & Yarden, 2006).

A ativação dos receptores EGFR/ERBB pelos ligantes induz a dimerização destes, seguida de fosforilação de resíduos de tirosina, responsável por iniciar a transdução de sinais e consequente cascata de eventos intracelulares, e internalização do complexo ligante-receptor. Após a internalização, o ligante é degradado nos lisossomos e o receptor é reciclado a partir do compartimento endossomal e retorna para o mesmo domínio da membrana plasmática onde se originou, iniciando novamente o processo de sinalização (Figura 2). Esse mecanismo é semelhante entre os diferentes ligantes da família EGF (Yarden, 2001; Singh & Harris, 2005; Citri & Yarden, 2006).

O processo de internalização do EGFR desempenha importantes funções no ciclo de vida do receptor, podendo induzir a diminuição da sua expressão na membrana plasmática (*downregulation*) e, ainda, contribuir como mediadores da sinalização mitogênica (Kim et al., 2003). Esses eventos controlam uma variedade de respostas biológicas como proliferação, diferenciação, migração e a modulação da apoptose (Roskoski et al., 2004). Entretanto, mutações e super-expressões envolvendo esses fatores têm sido frequentemente citadas e correlacionadas com doenças hiperproliferativas como o câncer (Hynes & Lane, 2005).

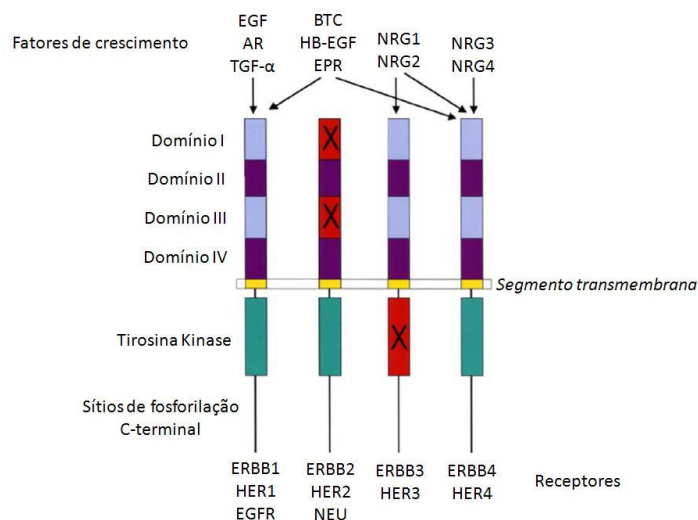


Figura 1. Família de ligantes semelhantes ao fator de crescimento epidermal – EGF (TGF- α : fator de crescimento transformante- α , HB-EGF: fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina, AR: anfiregulina, EPR: epiregulina, BTC: betacelulina e NRG1-4: neuregulinas 1 a 4) e seus receptores (EGFR/ERBB1/HER1; ERBB2/HER2/NEU; ERBB3/HER3; ERBB4/HER4). Cada receptor é composto por quatro domínios extracelulares, um domínio intracelular tirosina quinase e um sítio de fosforilação C-terminal. Os domínios de ligação I e III do ERBB2, bem como o sítio de fosforilação da tirosina quinase do receptor ERBB3 (HER3) inativos estão representados por X. Fonte: Adaptado de Roskoski (2004).

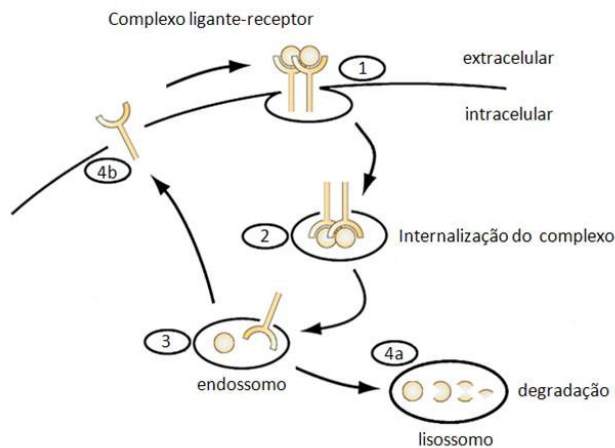


Figura 2. Regulação do processo de sinalização dos membros da família EGF. (1) Formação de homodímeros ou heterodímeros. (2) Endocitose e internalização do complexo ligante-receptor. (3) Dissociação do complexo ligante-receptor no compartimento endossomal. (4a) Degradação do ligante nos lisossomos. (4b) Expressão do receptor reciclado na superfície da membrana celular. Adaptado de Citri & Yarden (2006).

PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO

Em condições fisiológicas de expressão do receptor, a associação do ligante ao domínio extracelular provoca uma mudança conformacional que induz a

dimerização do receptor, levando ao aumento da atividade quinase e autofosforilação dos resíduos de tirosina (Greenfield et al., 1989). Esses resíduos de tirosina fosforilados servem como sítios para moléculas adaptadoras e sinalizadoras responsáveis por iniciar uma série de cascatas de eventos

intracelulares. Dependendo do ligante, a família de receptores ERBB pode formar quatro homodímeros ou seis heterodímeros. O ERBB2 é o receptor mais comum na formação de heterodímeros, sendo os mais frequentemente encontrados ERBB1-ERBB2, ERBB2-ERBB3 e ERBB2-ERBB4 (Graus-Porta et al., 1997; Zaczek et al., 2007). Essa característica pode ser explicada pela estrutura de sua região extracelular (Hynes & Lane, 2005), cujos domínios de ligação I e III são inativos (Figura 1 - Roskoski, 2004). A heterodimerização aumenta a diversidade de ligantes reconhecidos pelos receptores individuais, além de permitir o recrutamento de diferentes moléculas adaptadoras e sinalizadoras, que ativam diferentes vias de sinalização (Yarden, 2001; Roskoski, 2004).

A cascata de transdução do sinal via ativação do EGFR/ERBB é bastante complexa e envolve inúmeras vias de sinalização celular. Contudo, algumas vias que auxiliam na transmissão de sinais dos receptores tirosina quinases ao núcleo já foram identificadas, sendo as principais: (a) via RAS/RAF/MAPK, (b) via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e (c) via STAT, que podem ser visualizadas na Figura 3, tendo como base a ligação do EGF.

A ativação das proteínas RAS/RAF pelos receptores tirosina quinase possui meia vida muito curta,

tornando este estímulo insuficiente para induzir a proliferação ou diferenciação celular. Na tentativa de tornar esses eventos mais duradouros, um sistema de transmissão composto por múltiplas cascatas de sinalização é ativado (Alberts et al., 1997). As proteínas RAS e RAF ativadas fosforilam as MEK (quinase ativadora da MAPK), as quais ativam as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Moraes, 2008). A ativação da MAPK é um evento chave para muitos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (Davis, 1993).

A via PI3-quinase (PI3K) é considerada um padrão de sinalização “clássico” consistindo de várias moléculas sinalizadoras incluindo quinases, fosfatases e fatores transcricionais que estabelecem cascatas de sinalização intracelular fundamentais para regulação da proliferação celular, sobrevivência, migração e metabolismo (Blume-Jensen & Hunter, 2001; Cantley, 2002). Das três classes de PI3-Ks conhecidas, somente a classe Ia é ativada pelos receptores do tipo tirosina quinase. A interação entre PI3-K e os receptores EGFR/ERBB é requerida para ativação desta via (Carpenter et al., 1993). O principal mediador da ação da via PI3-K na sobrevivência e proliferação é a molécula sinalizadora Akt, também conhecida como proteína quinase B (PKB), e pode ainda ser o principal mediador dos efeitos antiapoptóticos da ativação do EGFR.

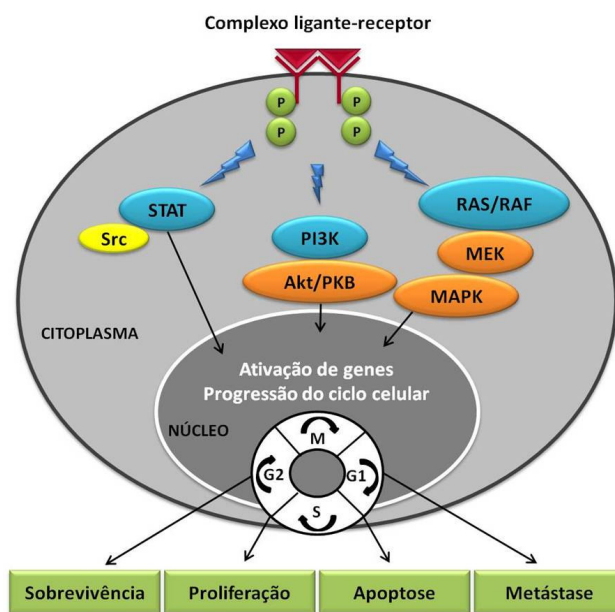


Figura 3. Ativação do ciclo celular (sobrevivência, proliferação, apoptose e metástase) por diferentes vias de sinalização, decorrente da fosforilação dos resíduos de tirosina quinase induzida pela ligação do ligante (EGF) ao receptor EGFR.

As proteínas STAT, têm sido implicadas na sinalização do EGFR. Entretanto, o modo de ativação parece ser significativamente diferente daqueles utilizados por receptores de citocinas, que são mediados pela família JAK quinases (revisado por Leonard, 2001). Estudos apontam que as STAT são constitutivamente associadas com EGFR (Olayioye et al., 1999; Xia et al., 2002). Em adição, estudos têm implicado a Src quinase na ativação de STAT dependente de EGF (Olayioye et al., 1999; Kloth et al., 2003), não estando ainda claro nesse caso se a Src atua aumentando ou diminuindo a ativação do EGFR.

LOCALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DO LIGANTE EGF E RECEPTOR EGFR NO OVÁRIO

Inúmeros estudos têm demonstrado que o EGF é um potente fator mitogênico, capaz de estimular a proliferação de diferentes tipos celulares, incluindo as células somáticas ovarianas (Toyoda et al., 1997). Dessa forma, diversos estudos têm examinado a localização de ligantes específicos aos receptores ERBB/EGFR durante as várias fases da foliculogênese em diferentes espécies (hamster: Roy & Greenwald, 1990; humano: Maruo et al., 1993; suíno: Singh et al., 1995; caprino: Gall et al., 2004). No entanto, o padrão de expressão dos ligantes, bem como dos receptores desses fatores tem gerado resultados conflitantes durante o desenvolvimento folicular. Em relação ao EGF, Lafky et al. (2008) sugerem que as discrepâncias no padrão de expressão desse ligante, bem como de seu receptor durante o desenvolvimento folicular, podem ser atribuídas ao uso de diferentes técnicas, bem como a espécie estudada.

Estudos na área de biologia molecular têm demonstrado a expressão da proteína e RNAm para EGF e seu receptor no oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais de ratas (Feng et al., 1987), porcas (Singh et al., 1995), vacas (Lonergan et al., 1996), camundongas (Hill et al., 1999), mulheres (Qu et al., 2000), hamsters (Garnett et al., 2002) e macacas (Fru et al., 2007), além de células luteais de ratas (Tekpetey et al., 1995), porcas (Singh et al., 1995) e macacas (Fru et al., 2007).

Especificamente na espécie humana, a presença de EGF e EGFR foi confirmada em todas as fases do desenvolvimento folicular, exceto em folículos primordiais e corpus albicans (Maruo et al., 1993). Nesta mesma espécie, Reeka et al. (1998) observaram que a marcação para EGF foi detectada em células da granulosa e da teca interna de folículos em desenvolvimento, porém durante a maturação

folicular essa marcação é reduzida. Além disso, Qu et al. (2000) verificaram uma fraca marcação para EGF em oócitos tanto de folículos primordiais como de primários e, em células da teca de folículos maduros. Contudo, sua presença não foi detectada nas células da granulosa de nenhuma categoria folicular. Em contrapartida, Tamura et al. (1995) não detectaram marcação para EGF em qualquer fase do crescimento folicular e durante a regressão luteal.

Em outras espécies, tanto a proteína como o RNAm para o EGF, têm sido demonstrados durante o desenvolvimento folicular. Na espécie caprina, Gall et al. (2004) demonstraram que a expressão de RNAm para EGFR está presente nos oócitos meioticamente competentes e não competentes, além das células da granulosa murais e células do cumulus de folículos pré-ovulatórios. Nesta mesma espécie, Silva et al. (2006) verificaram que o EGF e seu receptor são expressos nos folículos ovarianos em todos os estádios de desenvolvimento, no corpo lúteo, bem como na superfície do epitélio ovariano (Figura 4).

EFEITO DO EGF SOBRE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR

Diversos estudos têm demonstrado que a foliculogênese ovariana é regulada por vários fatores de crescimento e hormônios (Fortune, 2003; Van Den Hurk & Zhao, 2005). A regulação via fatores de crescimento ocorre principalmente na fase pré-antral, que consiste na fase inicial de crescimento folicular, incluindo os folículos primordiais, de transição, primários e secundários. Enquanto a regulação hormonal ocorre predominantemente na fase antral – fase final de desenvolvimento folicular, isto é, em folículos terciários e pré-ovulatórios (Campbell, 2009).

Folículos pré-antrais

Estudos *in vitro* com folículos pré-antrais de diferentes espécies têm demonstrado que o EGF promove o crescimento (bubalinos: Gupta et al., 2002; ovinos: Hemamalini et al., 2003), a proliferação das células da granulosa (suíno: Morbeck et al. 1993; Demeestere et al., 2005), reduz a taxa de atresia folicular (bovinos: Gutierrez et al., 2000; suínos: Mao et al., 2004; caprinos: Zhou & Zhang, 2005) e mantém a viabilidade folicular (ovinos: Andrade et al., 2005). Além disso, o EGF parece regular positivamente a expressão de receptores para TGF- β e gonadotrofinas em folículos pré-antrais de hamsters (Yang & Roy, 2001; Garnett

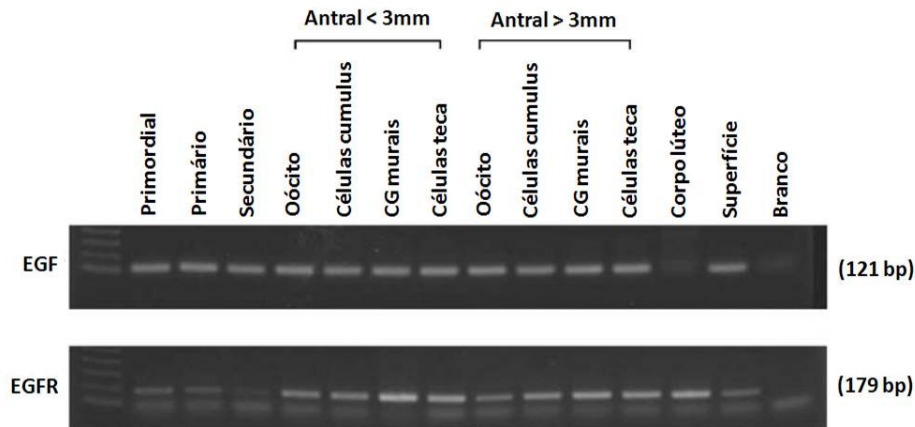


Figura 4. Expressão de RNAm para a proteína EGF e seu receptor EGFR em diferentes tipos de células no ovário caprino, incluindo cada compartimento de pequenos e grandes folículos antrais, utilizando RT-PCR. Fonte: Silva et al., 2006.

et al., 2002), bem como a expressão da proteína conexina 43 em suínos (Bolamba et al., 2002) e coelhos (Kennedy et al., 2003).

Em suínos, o EGF (10 ng/mL) inibiu a apoptose das células da granulosa e promoveu a formação de antro em folículos secundários isolados cultivados *in vitro* (Mao et al., 2004). Além disso, também foi demonstrado que o EGF associado ao hormônio folículo estimulante (FSH) melhorou a qualidade dos oócitos promovendo uma maior taxa de desenvolvimento embrionário (Wu & Tian, 2007). Na espécie bovina, o EGF (10 ng/mL) não exerceu efeito sobre a ativação e sobrevivência de folículos pré-antrais cultivados *in situ*, ou seja, inclusos em fragmentos de tecido cortical ovariano (Derrar et al., 2000). No entanto, os efeitos positivos do EGF sobre folículos pré-antrais isolados do ovário bovino têm sido frequentemente relatados. Wandji et al. (1996) verificaram que após seis dias de cultivo na presença de 50 ng/mL de EGF, folículos primários e secundários (60-179 μ m), isolados enzimaticamente do ovário de fetos bovinos, aumentaram o diâmetro, a sobrevivência folicular, bem como a secreção de progesterona e estradiol. Além disso, Gutierrez et al. (2000) isolaram folículos pré-antrais secundários bovinos e, após 28 dias de cultivo, observaram que o EGF promoveu o crescimento folicular e aumentou as taxas de formação de antro. Estudos realizados na espécie caprina mostraram que o EGF na concentração de 50 ng/mL estimulou a viabilidade oocitária (Zhou & Zhang, 2005). Por outro lado, um estudo realizado com folículos *in situ*, a concentração de 100 ng/mL promoveu efeito benéfico no crescimento de oócitos de folículos pré-

antrais primários (Silva et al., 2004). Celestino et al. (2009) relataram que baixas concentrações de EGF (1 ou 10 ng/mL), mantiveram a viabilidade folicular e a transição de folículos primordiais caprinos para primários após sete dias de cultivo.

Folículos antrais

Estudos recentes têm fornecido subsídios adicionais para a compreensão da complexa rede EGF no ovário dos mamíferos. Durante a fase antral tardia, sobretudo no período pré-ovulatório, o EGF estimula a retomada da meiose em oócitos de diferentes espécies (bovinos: Lonergan et al., 1996; humanos: Goud et al., 1998; ovinos: Guler et al., 2000; suínos: Prochazka et al., 2003; caprinos: Gall et al., 2004 e roedores: Reizel et al., 2010). Além disso, o EGF em folículos antrais parece ser fundamental na manutenção da viabilidade (ovinos: Hemamalini et al., 2003), expansão das células do cumulus (camundongas: O'Donnell et al., 2004), proliferação das células da granulosa (suínos: May et al., 1992; caprinos: Rajarajan et al., 2006) e produção de esteróides (humanos: Misajon et al., 1999). Esse conjunto de ações parece ocorrer através de receptores funcionais expressos em diversos compartimentos foliculares (Silva et al., 2006).

Em porcas e camundongas, as concentrações fisiológicas de EGF presente no fluido folicular é cerca de 1 (Hsu et al., 1987) e 10 ng/mL (Demeestere et al., 2005), respectivamente. Recentemente, foi demonstrado que esse fator além de atuar sozinho, parece interagir positivamente com

as gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento durante a fase final de desenvolvimento folicular (Reizel et al., 2010). O efeito benéfico dessa interação tem sido correlacionado com o acúmulo gradativo de RNAm para essas substâncias a medida que o folículo cresce, preparando o complexo cumulus-oócito (COC) para completar a maturação (Gall et al., 2004). Todos esses achados sugerem que o EGF é um dos principais fatores responsável por estimular o crescimento folicular, bem como a maturação oocitária (Lonergan et al., 1996). O resumo das principais ações do EGF sobre o desenvolvimento folicular, tanto em folículos pré-antrais como antrais, pode ser observado na Tabela 1.

EFEITO DO EGF SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

As condições de maturação oocitária *in vitro* ainda são menos efetiva do que as condições *in vivo* (Gonçalves et al., 2008). Com a finalidade de melhorar essas condições, diversos experimentos vêm sendo realizados com o intuito de determinar o papel de diferentes fatores de crescimento durante a maturação dos complexos cumulus-oócito (CCO) em várias espécies (cabras: Gall et al., 2004, 1985; mulheres: Goud et al., 1998; porcas Prochazka et al., 2003). Dentre esses fatores, destacam-se alguns membros da família EGF, como o EGF, AR, EPR e BTC (Conti et al., 2006). Apesar desses fatores

Tabela 1. Resumo das principais implicações do EGF no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais e antrais em diferentes espécies.

Espécie	Folículos pré-antrais	Referências	Folículos antrais	Referências
Roedores	↑ Diâmetro folicular ↑ Multiplicação CG	Demeestere <i>et al.</i> (2005)	↑ Expansão das células do cumulus	Reizel <i>et al.</i> (2010)
			↑ Retomada da meiose	O'Donnell <i>et al.</i> (2004)
Suínos	↑ Diâmetro folicular ↑ Multiplicação CG	Morbeck <i>et al.</i> (1993)		
	↑ Formação de antro ↑ Desenvolvimento de primários para secundários		↑ Retomada da meiose	Prochazka <i>et al.</i> (2003)
	↓ Atresia folicular ↓ Apoptose		↑ Proliferação CG	May <i>et al.</i> (1992)
Ovinos	↑ Viabilidade folicular	Andrade <i>et al.</i> (2005)	↑ Retomada da meiose	Guler <i>et al.</i> (2000)
			↑ Sobrevivência folicular	Hemamalini <i>et al.</i> (2003)
Caprinos	↓ Atresia folicular ↑ Viabilidade oocitária	Zhou & Zhang (2005)	↑ Retomada da meiose	Gall <i>et al.</i> (2004)
	↑ Viabilidade folicular ↑ Transição de primordiais para primários		↑ Proliferação CG	Rajarajan <i>et al.</i> (2006)
Bovinos	↑ Diâmetro folicular ↑ Progesterona e estradiol ↑ Viabilidade folicular	Wandji <i>et al.</i> (1996)		
	↓ Atresia folicular ↑ Formação de antro ↑ Taxa de crescimento		↑ Retomada da meiose	Lonergan <i>et al.</i> (1996)
Humanos	↑ Diâmetro folicular ↑ Multiplicação CG	Roy & Kole (1998)	↑ Retomada da meiose	Goud <i>et al.</i> (1998)
			↑ Proliferação CG	Misajon <i>et al.</i> (1999)

CG - células da granulosa; ↑ - aumento; ↓ - diminuição

estarem expressos em diferentes compartimentos foliculares durante a folliculogênese, acredita-se que o nível de expressão em folículos pré-ovulatórios seja estimulado pela ação do hormônio luteinizante (LH - Reizel et al., 2010). Ashkenazi et al. (2005) demonstraram que a inibição do EGFR através de anticorpos específicos, como o *galardin*, promoveu o bloqueio da retomada da meiose em oócitos de camundongos tratados com LH, aumentando assim a proporção de oócitos em estágio de vesícula germinativa. Além disso, Prada et al. (2009) verificaram que a expressão de RNAm para fatores de crescimentos semelhantes ao EGF em células do cumulus de oócitos de macacas rhesus, após tratamento com LH, aumentou significativamente em oócitos que atingiram o estágio de metáfase II (MII).

Em canídeos domésticos, Bolamba et al. (2006) demonstraram que o EGF sozinho não exerceu efeito sobre a expansão das células do cumulus, bem como na maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro*. Entretanto, quando este fator foi adicionado ao meio de cultivo contendo FSH e LH, verificou-se um aumento significativo na expansão dessas células. Em felídeos, o EGF não induziu a maturação nuclear, porém melhorou a maturação citoplasmática e a competência de desenvolvimento oocitário, com conseqüente aumento na taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* (Merlo et al., 2005). Por outro lado, em bovinos Lonergan et al. (1996) demonstram que a suplementação do meio de MIV com EGF em diferentes concentrações (1 - 100 ng/mL) estimulou a expansão das células do cumulus, aumentou a porcentagem de oócitos que atingiram o estágio de MII, bem como a proporção de embriões que chegaram ao estágio de blastocisto.

In vitro, a estimulação da aquisição da competência meiótica oocitária pelo EGF (Ashkenazi et al., 2005; Conti et al., 2006) parece ocorrer através de uma cascata de sinalização que pode ser mediada ou não pelas células do cumulus (Jamnongjit et al., 2005). Em caprinos, Gall et al. (2004) demonstraram que o EGF pode se ligar ao seu receptor específico localizado nas células foliculares ou diretamente no oócito, sendo portanto, um importante sinalizador durante o processo de maturação e início do desenvolvimento embrionário nesta espécie.

EFEITO DO EGF SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Nas últimas décadas, uma variedade de moléculas foi identificada como potenciais mediadores da interação embrião-útero durante a implantação, incluindo diversos fatores de crescimento (Stewart et

al., 1992). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o TGF- α , o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb), o fator de crescimento semelhante à insulina-2 (IGF-2) e o EGF, por exemplo, são responsáveis por aumentar a aderência do trofoblasto ao endométrio uterino (Haimovici & Anderson, 1993).

O EGF é capaz de estimular, em condições *in vitro*, a síntese de DNA, RNA e proteínas, a proliferação celular, além da expansão do trofoblasto e blastocisto (Haimovici & Anderson, 1993). No entanto, o EGF não é expresso no período pré-implantacional no útero de camundongos, sugerindo que outros membros da família EGF também possam ativar o receptor EGFR/ERBB durante o desenvolvimento do trofoblasto (Machida et al., 1995). Especialmente o HB-EGF, identificado pela primeira vez como fator mitogênico produzido por uma linhagem de células semelhantes aos macrófagos (Higashiyama et al., 1991). O HB-EGF tem sua atividade potencializada pelo sulfato de heparina presente na superfície de células-alvo, sendo descrito como o principal mediador da implantação embrionária em várias espécies (Lim & Dey, 2009). Existem evidências crescentes de que o HB-EGF participa de uma ampla série de processos fisiológicos, incluindo a sinalização molecular entre embriões e útero durante o processo de implantação (Xie et al., 2007). A proteína HB-EGF pode ser expressa ancorada à membrana e/ou em formas solúveis no epitélio luminal uterino, bem como no blastocisto antes e durante a reação de fixação no endométrio (Wang et al., 2000).

Em embriões de coelhas, Klonisch et al. (2001) verificaram que a presença de transcritos para o receptor de HB-EGF é bastante acentuada em células do trofotoderma, bem como no trofoblasto placentário. Em humanos, o efeito estimulante do HB-EGF sobre o desenvolvimento de embriões parece ocorrer a partir do estágio de oito células, coincidindo com o momento em que há expressão do receptor para o HB-EGF e EGFR (Chia et al., 1996). Além disso, foi demonstrado que esse fator também é expresso no endométrio uterino (Yoo et al., 1997).

Em camundongos, além da presença de HB-EGF no embrião durante o desenvolvimento pré-implantacional (Wiley et al., 1992), sua expressão também foi detectada nas regiões da ampola e istmo do oviduto (Dalton et al., 1994), bem como no epitélio luminal uterino (Das et al., 1994). Já em ratas, sugere-se a existência de um papel parácrino para HB-EGF materno, uma vez que o embrião não expressa RNAm para esse ligante (Das et al., 1994). Esses estudos sugerem que o HB-EGF é uma

importante molécula reguladora da atividade embrionária durante os processos de implantação e placentação inicial.

CONCLUSÕES

Avanços significativos no entendimento do complexo sistema de sinalização envolvendo ligantes e receptores da família EGF foram alcançados nos últimos anos. Apesar disso, os mecanismos de sinalização controlados por diferentes moléculas, sobretudo no processo de foliculogênese ovariana ainda permanecem pouco compreendidos. Dessa forma, tornam-se necessários estudos mais detalhados sobre o sistema EGF (complexo ligante-receptor) no ovário dos mamíferos. A elucidação sobre o papel do sistema EGF poderá contribuir para o entendimento da biologia ovariana, bem como para maximizar as técnicas de reprodução assistida *in vitro* de folículos e embriões. Além disso, poderá também fornecer subsídios imprescindíveis para o avanço da clínica reprodutiva como estratégia terapêutica no combate a doenças hiperproliferativas (câncer), tanto na medicina veterinária como humana.

REFERÊNCIAS

- Alberts J.L., Boyle J.P., Roberts J.A., Challis R.A.J., Gubby S.E. & Boarder M.R. 1997. Regulation of brain capillary endothelial cells by P2Y receptors coupled to Ca²⁺, phospholipase C and mitogen-activated protein kinase. *Br. J. Pharmacol.* 122: 935-941.
- Andrade E.R., Seneda M.M., Alfieri A.A., Oliveira J.A., Bracarense A.P.F.R.L., Figueiredo J.R. & Tonioli R. 2005. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology.* 64:1104-1113.
- Ashkenazi H., Cao X., Motola S., Popliker M., Conti M. & Tsafiriri A. 2005. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinol.* 146:77-84.
- Blume-Jensen P. & Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 411:355-365.
- Bolamba D., Floyd A.A., McGlone J.J. & Lee. V.H. 2002. Epidermal Growth Factor Enhances Expression of Connexin 43 Protein in Cultured Porcine Preantral Follicles. *Biol. Reprod.* 67:154-160.
- Bolamba D., Russ K.D., Harper S.A., Sandler J.L. & Durrant B.S. 2006. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*. *Theriogenology.* 65:1037-1047.
- Campbell B.K. 2009. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Anim. Reprod.* 6:159-171.
- Cantley L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 296:1655-1657.
- Carpenter C.L., Auger K.R., Chanudhuri M., Yoakim M., Schaffhausen B., Shoelson S. & Cantley L.C. 1993. Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J. Biol. Chem.* 268:9478-9483.
- Casalini P., Iorio M.V., Galmozzi E. & Menard S. 2004. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J. Cell. Physiol.* 200: 343-350.
- Celestino J.J.H., Bruno J.B., Lima-Verde I.B., Matos M.H.T., Saraiva M.V.A., Chaves R.N., Martins F.S., Lima L.F., Name K.P.O., Campello C.C., Silva J.R.V., Bao S.N. & Figueiredo J.R. 2009a. Recombinant Epidermal Growth Factor Maintains Follicular Ultrastructure and Promotes the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured *In vitro*. *Reprod. Sci.* 16:239-246.
- Celestino J.J.H., Matos M.H.T., Saraiva M.V.A. & Figueiredo J.R. 2009b. Regulation of ovarian folliculogenesis by Kit Ligand and the c-Kit system in mammals. *Anim. Reprod.* 6:431-439.
- Chia C.M., Winston R.M. & Handyside A.H. 1996. EGF, TGF-alpha and EGFR expression in human preimplantation embryos. *Development.* 121: 299-307.
- Citri A. & Yarden Y. 2006. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Mol. Cell. Biol.* 7:505-516.
- Conti M., Hsieh M., Park J.Y. & Su Y.Q. 2006. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinol.* 20:715-723.
- Dalton T., Kover K., Dey S.K. & Andrews G.K. 1994. Analysis of the Expression of Growth Factor, Interleukin-1, and Lactoferrin Genes and the Distribution of Inflammatory Leukocytes in the Preimplantation Mouse Oviduct. *Biol. Reprod.* 51:597-606.
- Das S.K., Wang X.N., Paria B.C., Damm D., Abraham J.A., Klagsbrun M., Andrews G.K. & Dey S.K. 1994. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development.* 120:1071-1083.
- Davies R.L., Grosse V.A., Kucherlapati R. & Bothwell M. 1980. Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 4188-92.
- Davis R.J. The Mitogen-activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:14553-14556.
- Demeestere I., Centner J., Gervy Y., Englert Y. & Delbaere A. 2005. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction.* 130:147-156.
- Derrar N., Price C.A. & Sirard M.A. 2000. Effects of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial in explants of bovine ovarian cortex. *Theriogenology.* 54:587-598.
- Farin C.E., Rodriguez K.F., Alexander J.E., Hockney J.E., Herrick J.R. & Kennedy-Stoskopf S. 2007. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 98:97-112.
- Feng P., Knecht M. & Catt K. 1987. Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during

- granulosa cell differentiation. *Endocrinology*. 120:1121-1126.
- Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78:135-163.
- Fru K.N., Cherian-Shaw M., Puttabyatappa M., VandeVoort C.A. & Chaffin C.L. 2007. Regulation of granulosa cell proliferation and EGF-like ligands during the periovulatory interval in monkeys. *Hum. Reprod.* 22:1247-1252.
- Gall L., Chene N., Dahirel, M., Ruffini, S. & Boulesteix C. 2004. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. *Mol. Reprod. Dev.* 67:439-445.
- Garnett K., Wang J. & Roy S.K. 2002. 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. *Biol. Reprod.* 67:1593-1604.
- Gonçalves P.B.D., Oliveira M.A.L., Mezzalira A., Montagner M.M., Vistini J.A. & Costa L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal, Roca: São Paulo, 2ª ed., 2008, p.261-291.
- Goud P.T, Goud A.P, Qian C., Laverge H., Elst J.V., Sutter P.D. & Dhont M. 1998. *In vitro* maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and EGF in the culture medium. *Hum. Reprod.* 13:1638-44.
- Graus-Porta D., Beerli R.R., Daly J.M. & Hynes N.E. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO. J.* 16:1647-1655.
- Greenfield C., Hiles I., Waterfield MD, Federwisch M, Wollmer A, Blundell TL. & Mcdonald N. 1989. Epidermal growth factor binding induces a conformational changes in the external domain of its receptor. *EMBO. J.* 8:4115-4123.
- Guler A., Poulin N., Mermillod P., Terqui M. & Cognié Y. 2000. Effect of growth factors, EGF and EGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep. *Theriogenology*. 54:209-218.
- Gupta P.S., Nandi S., Ravindranatha B.M. & Sarma P.V. 2002. *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology*. 57:1839-1854.
- Gutierrez C.G., Ralph J.H., Telfer E.E., Wilmut I. & Webb R. 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol. Reprod.* 62:1322-1328.
- Haimovici F. & Anderson D.J. Effects of growth factors and growth factor-extracellular matrix interactions on mouse trophoblast outgrowth *in vitro*. 1993. *Biol. Reprod.* 49:124-130.
- Hatoya S., Sugiyama Y., Nishida H., Okuno T., Torii R., Sugiura K., Kida K., Kawate N., Tamada H. & Inaba T. 2008. Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology*. 71:560-567.
- Hemamalini N.C, Rao B.S., Tamilmani G., Amarnath D., Vagdevi R., Naidu K.S., Reddy K.K. & Rao V.H. 2003. Influence of transforming growth factor- α , insulin like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small. Rum. Res.* 50:11-22.
- Herbst R.S. 2004. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 59:21-26.
- Higashiyama S., Arraham J.A., Miller J., Fiddes J.C. & Klagsbrun M. 1991. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*. 251:936-939.
- Hill J.L., Hammar K., Smith P.J. & Gross D.J. 1999. Stage dependent effects of epidermal growth factor on Ca²⁺ efflux in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 53:244-53.
- Hsu C.J., Holmes S.D. & Hammond J.M. 1987. Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147:242-247.
- Hynes N.E. & Lane H.A. 2005. ERBB Receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature*. 5:341-354.
- Iwamoto R. & Mekada E. 2000. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth F. R.* 11:335-344.
- Jamnongjit M., Gill A. & Hammes S.R. 2005. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:16257-16262.
- Kennedy K.L., Floyd A.A., Clarkson A.M. & Lee V.H. 2003. Epidermal growth factor regulation of connexin 43 in cultured granulosa cells from preantral rabbit follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 64:61-69.
- Kim J., Ahn S., Guo R. & Daaka Y. 2003. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Internalization by G Protein-Coupled Receptors. *Biochemistry*. 42:2887-2894.
- Klonisch T., Wolf P., Hombach-Klonisch S., Vogt S., Kuechenhoff A., Tetens F. & Fischer B. 2001. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst. *Biol. Reprod.* 64:1835-1844.
- Kloth M.T., Laughlin K.K., Biscardi J.S., Boerner J.L., Parsons S.J. & Silva C.M. 2003. STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 278:1671-1679.
- Lafky J.M., Wilken J.A., Baron A.T. & Maihle N.J. 2008. Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1785:232-65.
- Leonard W.J. Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. 2001. *Int. J. Hematol.* 73:271-277.
- Lim H.J. & Dey S.K. 2009. HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp. Cell Res.* 315:619-626.
- Loneragan P., Carolan C., Van Langendonck A., Donnay I., Khatir H. & Mermillod P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 54:1420-1429.
- Machida T., Taga M. & Minaguchi H. 1995. Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha on the mouse trophoblast outgrowth *in vitro*. *Eur. J. Endocrinol.* 133:741-746.
- Mao J., Smith M.F., Rucker E.B., Wu G.M., McCauley T.C., Cantley T.C., Prather R.S., Didion B.A. & Day B.N. 2004. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 82:1967-1975.
- Maruo T., Ladines-Llave C.A., Samoto T., Matsuo H., Manalo

- A.S., Ito H. & Mochizuki M. 1993. Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology*. 132:924-931.
- Massague J. & Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. 1993. *Annu. Rev. Biochem.* 62:515-541.
- May J.V., Bridge A.J., Gotcher E.D. & Gangrade BK. 1992. The regulation of porcine theca cell proliferation *in vitro*: synergistic actions of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *Endocrinology*. 131:689-697.
- Merlo B., Iacono E., Zambelli D., Prati F. & Belluzzi S. 2005. Effect of EGF on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology*. 63:2032-2039.
- Misajon A., Hutchinson P., Lolatgis N., Trounson A.O. & Almahbobi G. 1999. The mechanism of action of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha on aromatase activity in granulosa cells from polycystic ovaries. *Mol. Hum. Reprod.* 5:96-103.
- Morbeck D.E., Flowers W.L. & Britt J.H. 1993. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 99:577-584.
- Nicholson K.M. & Anderson N.G. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 14:381-395.
- O'Donnell J.R., Hill J.L. & Gross D.J. 2004. Epidermal growth factor activates cytosolic [Ca²⁺] elevations and subsequent membrane permeabilization in mouse cumulus-oocyte complexes. *Reproduction*. 127:207-220.
- Olayioye M.A., Beuving I., Horsch K., Daly J.M. & Hynes N.E. 1999. ErbB receptor-induced activation of Stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 274:17209-17218.
- Park J.Y., Su Y.Q., Ariga M., Law E., Jin S.L.C. & Conti M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 303:682-684.
- Prada J.K.N., Lee Y.S., Latham K.E., Chaffin C.L. & VandeVoort C.A. 2009. Role for cumulus cell-produced EGF-like ligands during primate oocyte maturation *in vitro*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296:1049-1058.
- Prochazka R., Kalab P. & Nagyova E. 2003. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 68:797-803.
- Qu J., Nisolle M. & Donnez J. 2000. Expression of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in follicles of human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Fertil. Steril.* 74:113-121.
- Rajarajan K., Rao B.S., Vagdevi R., Tamilmani G., Arunakumari G., Sreenu M., Amarnath D., Naik B.R. & Rao V.H. 2006. Effect of various growth factors on the *in vitro* development of goat preantral follicles. *Small. Rumin. Res.* 63:204-212.
- Reeka N., Berg F.D. & Brucker C. 1998. Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum. Reprod.* 13:2199-2205.
- Reizel Y., Elbaz J. & Dekel N. 2010. Sustained Activity of the EGF Receptor Is an Absolute Requisite for LH-Induced Oocyte Maturation and Cumulus Expansion. *Mol. Endocrinol.* 24:402-411.
- Riese D.J. & Stern D.F. 1998. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*. 20:41-48.
- Roskoski R. 2004. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:1-11.
- Rossi G., Macchiarelli G., Palmerini M.G., Canipari R. & Cecconi S. 2006. Meiotic spindle configuration is differentially influenced by FSH and epidermal growth factor during *in vitro* maturation of mouse oocytes. *Hum. Reprod.* 21:1765-1770.
- Roy K. & Greenwald G.S. 1990. *In vitro* effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor, and follicle-stimulating hormone on hamster follicular deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 44:889-896.
- Sanderson M.P., Dempsey P.J. & Dunbar A.J. 2006. Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. *Growth Factors*. 24:121-136.
- Silva J.R.V., Van den Hurk R., Matos M.H.T., Santos R.R., Pessoa C., Moraed M.O. & Figueiredo J.R. 2004. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*. 61:1691-1704.
- Silva J.R.V., Van den Hurk R. & Figueiredo J.R. 2006. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote*. 14:107-117.
- Singh A.B. & Harris R.C. 2005. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell. Signalling*. 17:1183-1193.
- Singh B., Rutledge J.M. & Armstrong D.T. 1995. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 40:391-399.
- Stewart C.L., Kaspar P., Brunet L.J., Bhatt H., Gadi I., Kontgen F. & Abbondanzo S.J. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 359:76-79.
- Tamura M., Sasano H., Suzuki T., Fukaya T., Funayama Y., Takayama K. & Takaya R., Yajima A. 1995. Expression of epidermal growth factors and epidermal growth factor receptor in normal cycling human ovaries. *Hum. Reprod.* 1642:1891-1896.
- Tekpetey F.R., Singh B., Barbe G. & Armstrong D.T. 1995. Localization of epidermal growth factor (EGF) receptor in the rat corpus luteum, and EGF and transforming growth factor-alpha stimulation of luteal cell steroidogenesis *in vitro*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 110:95-102.
- Toyoda H., Komurasaki T., Uchida D. & Morimoto S. 1997. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem. J.* 326:69-75.
- Van den Hurk R. & Zhao J. 2005. Formation of ovarian follicles and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63:1717-1751.
- Wandji S.A., Eppig J.J. & Fortune J.E. 1996. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*. 45:817-832.
- Wang J., Mayemik L., Schultz J.F. & Armant D.R. 2000. Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Development*. 127:33-44.

- Warren C.M. & Landgraf R. 2006. Signaling through ERBB receptors: Multiple layers of diversity and control. *Cell. Signal.* 18:923-933.
- Wiley L.M., Wu J.X., Harari I. & Adamson E.D. 1992. Epidermal growth factor receptor mRNA and protein increase after the four-cell preimplantation stage in mouse development. *Dev. Biol.* 149:247-260.
- Wu J. & Tian Q. 2007. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote.* 15:233-240.
- Xia W., Mullin R.J., Keith B.R., Li L., Ma H., Rusnak D.W., Owens G., Alligood K.J. & Spector N.L. 2002. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene.* 21:6255-6263.
- Xie H., Wang H., Tranguch S., Iwamoto R., Mekada E., Demayo F.J., Lydon J.P., Das S.K. & Dey S.K. 2007. Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:18315-18320.
- Yang P. & Roy S.K. 2001. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster preantral follicles *in vitro*. *Biol. Reprod.* 65:847-854.
- Yarden Y. 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer.* 37:3-8.
- Yoo H.J., Barlow D.H. & Mardon H.J. 1997. Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev. Genet.* 21:102-108.
- Zaczek A., Welnicka-Jaskiewicz M., Bielawski K.P., Jaskiewicz J., Badzio A., Olszewski W., Rhone P. & Jassem J. 2007. Gene copy numbers of *HER* family in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134:271-279.
- Zhou H. & Zhang Y. 2005. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28:235-242.