

Fator de crescimento derivado das plaquetas, retinol e insulina na regulação da maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário

[Platelet-derived growth factor, retinol and insulin in the regulation of bovine oocyte nuclear maturation and their consequent effect in the embryonic development]

E.B. Bortolotto¹, P.B.D. Gonçalves¹, J.P. Neves¹,
L.F.S. Costa¹, M.N. Maciel¹,
M.M. Montagner¹, A.M. Farias², P. Stranieri²

¹Departamento de Clínica de Grandes Animais
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM
97105-900 - Santa Maria, RS.

²Estudante de Graduação em Medicina Veterinária,
Bolsista de Iniciação Científica

Recebido para publicação, após modificações, em 19 de outubro de 2000.

Trabalho realizado com suporte financeiro do PRONEX

E-mail: bayard@lince.hcv.ufsm.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar as ações do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF; P), da insulina (I), do retinol (R) e de suas associações (PI, PIR, IR e PR) na maturação nuclear

(MN) de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário (DE). O meio básico para maturação dos oócitos nos diferentes tratamentos foi o TCM-199 modificado acrescido de PVA (controle). No DE, foram utilizados os grupos R, PIR, IR, um controle negativo (PVA) e um controle positivo, contendo soro fetal bovino e gonadotrofinas (SFBHOR). Os fatores P, I, R e suas associações não aceleraram a MN em 7h mas sim após 18h ($P < 0,001$), com exceção dos tratamentos R e PR, nos quais as percentagens de metáfase II foram, respectivamente, de 4,7% e 8,3%, similares à obtida no grupo-controle (0,0%). Considerando um nível de significância de $P < 0,0001$ em comparação ao grupo-controle, os maiores índices de metáfase II foram obtidos na presença das associações IR (19,0%) e PIR (21,3%). No DE, R (18,3%), PIR (13,9%) e IR (10,6%) incrementaram os índices de clivagem, comparados ao PVA (0,0%; $P < 0,001$), porém não atingiram os índices do grupo SFBHOR (53,8%; $P < 0,001$). Conclui-se que insulina e PDGF aceleram a MN e suas ações são potencializadas pelo retinol. Os índices de clivagem de oócitos maturados na presença de R, IR e PIR são superiores aos do PVA, mas significativamente inferiores aos maturados em SFBHOR.

Palavras-chave: Bovino, oócito, PDGF, insulina, retinol, maturação nuclear

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the effect of platelet-derived growth factor (PDGF; P), insulin (I) retinol, (R) and their interactions (PI, PIR, IR and PR) on oocyte nuclear maturation (NM) and, consequent, embryonic development (ED). The basic medium for oocyte maturation in the treatments was the modified TCM-199, supplemented with PVA (control). To study the embryonic development, the oocytes were divided in three treatments, R, PIR e IR, a negative (PVA) and a positive control group (containing calf fetal serum and gonadotrophic hormones; FCSHOR). The PDGF, insulin, retinol and their interactions did not change the kinetic of the NM, in seven hours of culture ($P=0.4492$) but it

changed after 18 hours of maturation ($P < 0.001$) except in the treatments R and PR ($P < 0.001$), in which the percentages of metaphase II were, respectively, 4.7% and 8.3%. These results were similar to the control group (0.0%). Considering a significant level of $P < 0.0001$ in comparison to the control group, the higher rates of metaphase II were obtained in the presence of IR (19.0%) and PIR (21.3%). The higher rates of MII were observed when the oocytes were matured in the presence of insulin and retinol. In the embryonic development, R (18.3%), PIR (13.9%) and IR (10.6%) increased the rate of cleavage when compared to PVA group (0.0%; $P < 0.001$). However, the oocytes were not competent enough to reach the rate obtained in the FCSHOR group (53.8%; $P < 0.001$). In conclusion, insulin and PDGF accelerate NM and their effects are enhanced by retinol. In the embryonic development, oocytes matured in the presence of either R, IR or PIR have higher cleavage rate than PVA group but lower than those matured in the FCSHOR group.

Keywords: Bovine, oocyte, PDGF, insulin, retinol, nuclear maturation.

INTRODUÇÃO

O processo de maturação nuclear de oócito compreende o término da primeira redução meiótica, incluindo as fases desde a progressão do estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica até metáfase II (MII). *In vivo*, esse processo tem início concomitantemente com o pico pré-ovulatório de LH (Edwards, 1965; Tsafriri & Kraicer, 1972; Sun & Moor, 1991) e, *in vitro*, com a retirada do oócito do ambiente folicular (Edwards, 1965; Donahue, 1968; Thibault, 1977). Para completar esse processo de maturação nuclear de oócitos bovinos, é requerido um período entre 18 a 24 horas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Sirard et al., 1989).

Vários estudos têm demonstrado a importância de fatores de crescimento (FCs) produzidos pelo ovário na maturação nuclear nas diferentes espécies de

mamíferos. Entre os diversos FCs relacionados com ação na maturação nuclear estão o PDGF e IGF-I. Os índices de blastocisto são incrementados quando PDGF estiver presente no período de maturação oocitária (Harper & Brackett, 1993) ou de desenvolvimento embrionário (Thibodeaux et al., 1993; Yang et al., 1993). A adição de IGF-I no meio de cultivo estimula a maturação de oócitos na presença ou ausência de células foliculares em suínos. Além disso, células ovarianas de bovinos e suínos produzem quantidades significativas desse FC (Sirotkin et al., 1998). O IGF-I associado ao FSH regulam a proliferação das células da granulosa, expansão das células do *cumulus oophorus* e atuam na indução da atividade esteroidogênica na regulação folicular (Armstrong et al., 1996). Durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos, insulina e IGF-I incrementam a percentagem de mórulas (Matsui et al., 1995). No entanto, não é conhecido como esses FCs atuam no oócito durante a maturação nuclear.

Os receptores para a insulina e IGF-I possuem estruturas similares e afinidade cruzada (Heyner et al., 1993). No entanto, a insulina possui um efeito metabólico mais potente do que o IGF-I (Hadley, 1988). Na foliculogênese, a insulina tem ação na manutenção e crescimento dos folículos primordiais e primários, e em baixas concentrações pode aumentar os índices de formação de folículos primários (Yu & Roy, 1999). Em ratos, a insulina tem ação sobre as células da granulosa estimulando a atividade esteroidogênica (Yu & Roy, 1999). Além disso, a insulina estimula o desenvolvimento de embriões bovinos com oito células até o estágio de blastocisto eclodido. A insulina nos estádios de mórula e blastocisto estimula a síntese de RNA e DNA (Paria & Dey, 1990).

Há evidências de que a vitamina A pode estar envolvida na síntese de receptores de FCs (Wolf, 1984), podendo haver interação entre FCs e retinol. Além disso, o retinol desempenha papel auxiliar no desenvolvimento embrionário, evitando a apoptose, por reduzir a ação de radicais livres desenvolvidos pelo próprio zigoto (Nonogaki et al., 1994). Com isso, incrementa o número de blastocistos expandidos produzidos *in vitro* (Montagner et al., 1999;

Montagner, 1999). Apesar desses efeitos positivos no desenvolvimento embrionário, o efeito do retinol na maturação de oócitos bovinos não foi ainda testado. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar os efeitos do PDGF, do retinol, da insulina e de suas interações na maturação nuclear de oócitos bovinos e suas conseqüências no desenvolvimento embrionário *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 1.260 ovários de fêmeas bovinas, obtidos em matadouro e transportados em solução de cloreto de sódio a 0,9% acrescido de penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (50µg/ml) à temperatura de 30°C. No laboratório, os ovários foram lavados três vezes com solução de cloreto de sódio a 0,9% e, logo após, os folículos entre 2 e 8mm de diâmetro foram puncionados, com auxílio de uma agulha acoplada em uma bomba de vácuo. Para o primeiro experimento, foram utilizados 1.360 complexos *cumulus*-oócito (CCOs) com pelo menos três camadas de células do *cumulus oophorus*, ooplasma de coloração marrom e homogêneo.

Os oócitos foram mantidos em líquido folicular não filtrado por um período de 10 a 15 minutos, até o momento da seleção. Após selecionados, um total médio de 272 oócitos, em cada replicação, foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos, totalizando cinco repetições. Os oócitos foram cultivados por períodos de 7 ou 18 horas. O meio de maturação utilizado teve como base o TCM-199 modificado (Nutricell) acrescido de 1mg/ml de álcool polivinílico (Sigma, P-8136) (PVA). Os sete grupos de tratamentos foram formados pela adição ao meio base de: (1) 0,1ng de PDGF (Sigma, P-8147)/ml de meio (P); (2) 0,28µg de retinol solúvel em água(Sigma, R-0635)/ml (R); (3) 0,12UI insulina (Sigma, I-6634) /ml (I); (4) 0,1ng de PDGF/ml acrescido de 0,28µg retinol/ml (PR); (5) 0,1ng de PDGF/ml acrescido de 0,12UI insulina/ml (PI); (6) 0,12UI insulina/ml acrescido de 0,28µg retinol/ml (IR); (7) 0,1ng de PDGF/ml acrescido de 0,12UI insulina/ml e 0,28µg retinol/ml (PIR). O grupo-controle foi constituído pelo meio básico (PVA). Após

alocados em cada grupo, os oócitos foram maturados em gotas com 200µl de meio, sob óleo de silicone 50 ctk (Agripec) e incubados em atmosfera contendo 5% de CO₂, umidade saturada e temperatura de 39°C.

Após cada período de incubação, os oócitos foram retirados de seus grupos com micropipeta de vidro e depositados em tubo de ensaio contendo 2ml de TCM-199 modificado. Em seguida, as células do *cumulus* foram retiradas com o auxílio de vórtex, e agitados por três minutos. Para parar a maturação às 7 e 18 horas, os oócitos foram fixados em placas contendo 3ml de ácido acético:metanol (1:3) por 12 horas. Após esse período, os oócitos foram colocados em lâminas e corados com lacmóide a 1% em 45% de ácido acético em PBS (Vignola et al., 1994). As avaliações dos estádios nucleares foram realizadas utilizando microscópio equipado com contraste de fase, em aumento de 1000×.

Para a realização do segundo experimento, foram utilizados um total de 505 CCOs com pelo menos três camadas de células do *cumulus oophorus*, ooplasma de coloração marrom e homogênea. A metodologia para a coleta, seleção e maturação dos oócitos foi a mesma do primeiro experimento. Para a maturação, os oócitos foram distribuídos em três grupos de tratamentos (R, PIR e IR), um grupo-controle negativo (PVA) e um grupo-controle positivo no qual estavam presentes soro fetal bovino e hormônios gonadotróficos (FSH, 0,5 µg/ml e LH, 5,0 µg/ml). Foram realizadas seis replicações. O período de maturação foi de 24 horas (Suss et al., 1988).

No final do período de maturação foi preparado um *pool* de sêmen congelado proveniente de touros de raças européias, utilizando uma única partida de sêmen durante todo o experimento. A recuperação espermática foi realizada com a passagem do sêmen em diferentes gradientes de percol (Rosenkrans et al., 1993; Schweitzer, 1996). Para isso, foram colocados 2,7ml de percol em frasco de vidro estéril com capacidade para 5ml. A esse volume foram adicionados 300µl de meio Sperm-TALP 10×, obtendo uma concentração de 90% de percol. A seguir, foi transferido para outro frasco um volume de 1ml de percol 90% e, a esse, adicionado 1ml de Sperm-TALP

1×, fazendo o percol a 45%. Em um tubo de centrífuga foram colocados 2ml de percol a 90% e, em seguida, lentamente adicionados 2ml de percol a 45%, de forma a não haver mistura entre as duas soluções, formando uma coluna de percol com diferentes gradientes. Após preparada a coluna de percol, foram colocados 500µl de sêmen sobre a coluna de percol e centrifugado por 30 minutos a 700G. Após o período de centrifugação, o *pellet* de espermatozóides foi ressuspensionado com 500µl de Fert-TALP sem heparina, ajustando a concentração espermática.

A inseminação (dia 0) dos oócitos maturados foi realizada pela adição de 50µl de espermatozóides às gotas de 200µl de meio Fert-TALP contendo 10µg de heparina/ml (Parrish et al., 1986; Schweitzer, 1996). A concentração final de espermatozóides foi de 2×10^6 /ml. O tempo de co-cultivo foi de 18 a 22 horas. A temperatura e a atmosfera de incubação foram as mesmas utilizadas para a maturação *in vitro*. Após a inseminação, as células do *cumulus* foram retiradas com uma micropipeta de vidro e os oócitos lavados três vezes e transferidos para as gotas de 200µl de TCM-Light (Romero et al., 1991) para o desenvolvimento embrionário. Após 48 horas do momento da inseminação, foram avaliadas as taxas de clivagem.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente ao acaso. Os diferentes tratamentos foram realizados simultaneamente e cada replicação considerada um bloco. Os resultados em percentagens foram transformados pelo PROC RANK no pacote estatístico SAS (SAS, 1988), com a finalidade de aplicação de testes paramétricos para a análise estatística. O modelo utilizado foi: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$, em que Y_{ij} é a variável dependente [no experimento 1, é a percentagem de oócitos que atingiram os estádios de rompimento da vesícula germinativa (RVG) ou MII e no experimento 2, é a percentagem de clivagem], μ é a constante comum para todas as observações, α_i é o efeito dos tratamentos, β_j é o efeito dos blocos e ϵ_{ij} é o efeito do resíduo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao interromper a maturação às 7 e 18 horas, períodos mínimos para os oócitos atingirem, respectivamente, as fases de RVG e MII, foi possível determinar a velocidade de reinício da meiose e completa maturação nuclear, utilizando como referência o grupo-controle. PDGF, retinol e insulina não alteraram a velocidade de reinício da meiose nas primeiras 7 horas de maturação ($P=0,4492$). Da mesma forma, não houve interação entre essas três substâncias nessa fase da maturação nuclear ($P>0,05$; [Fig. 1](#)). No entanto, foi observada variação significativa entre blocos ($P=0,0001$).

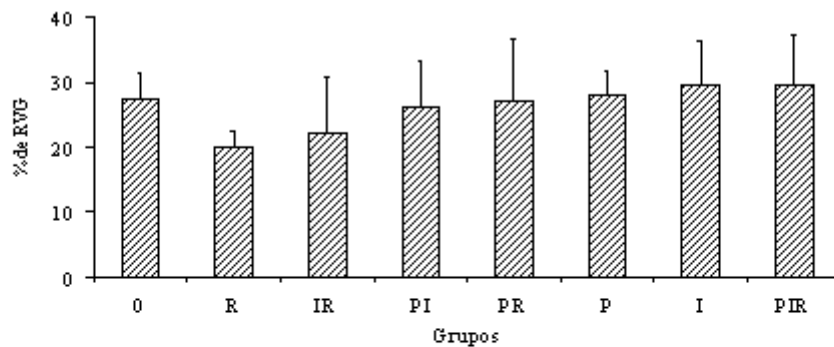


Figura 1. Efeito do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF; P), retinol (R), insulina (I) e suas associações no reinício da meiose de oócitos bovinos cultivados *in vitro*. No grupo-controle (0) esses fatores não estavam presentes. O índice de rompimento da vesícula germinativa (RVG) foi determinado sete horas após o início da maturação. As concentrações de retinol, PDGF e insulina foram $0,28\mu\text{g/ml}$, $0,1\text{ng/ml}$ e $0,12\text{UI}$, respectivamente. O resultado de cada grupo está representado em média e erro-padrão da média de cinco replicações. Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$).

Em contrapartida, quando os oócitos foram maturados em meio quimicamente definido por 18 horas e avaliados quanto ao estágio de MII em diferentes associações de PDGF, insulina e retinol na maturação nuclear, foi observada aceleração da meiose nos diferentes tratamentos ([Fig. 2](#)), com exceção daqueles maturados na presença de retinol ($P=0,3014$) e da associação PDGF-retinol ($P=0,0882$). O meio quimicamente definido para maturação nuclear dos oócitos permite uma avaliação específica da ação dos FCs e retinol, minimizando a possibilidade de outros componentes estarem

interferindo nos resultados, como pode ocorrer quando o soro está presente no meio de cultivo. Nesse sistema, a presença de insulina ($P=0,0313$) e PDGF ($P=0,0381$) aceleraram a maturação de oócitos isoladamente ou associados entre si (PDGF-insulina; $P=0,0020$). A presença do retinol, em meios contendo insulina ou PDGF não resultou em incremento significativo dos índices de MII. No entanto, ao considerar o nível de significância de $P<0,0001$ em comparação ao grupo-controle, os maiores índices de MII foram obtidos na presença das associações IR (19,0%) e PIR (21,3%).

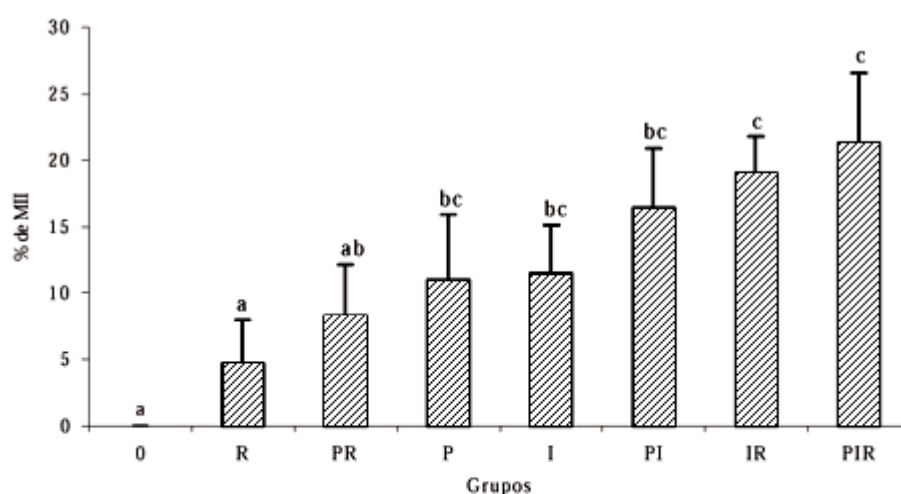


Figura 2. Efeito do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF; P), retinol (R), insulina (I) e suas associações na maturação nuclear de oócitos bovinos. O índice de metáfase II (MII) foi determinado 18 horas após o início da maturação. As concentrações de retinol, PDGF e insulina foram de 0,28 μ g/ml, 0,1ng/ml e 0,12UI, respectivamente. O resultado de cada grupo está representado em média e erro-padrão da média de cinco replicações. Letras diferentes, acima de cada barra, representam diferenças significativas entre grupos ($P<0,05$).

O ácido retinóico, por ativar a transcrição, quando ligado aos seus receptores nucleares α , β e γ em seqüências específicas de nucleotídeos nos genes-alvo (de Luca, 1991; Soprano et al., 1993), por atuar na diferenciação celular (Morriss-Kay & Sokolova, 1996) e por regular genes que codificam para a síntese de diversos reguladores bioquímicos, incluindo os FCs, é um candidato potencial para mediar a ação do PDGF e da insulina na maturação de oócitos bovinos. Por esse motivo, a ação esperada do PDGF, da insulina, do retinol e de suas interações seria uma mudança no reinício da meiose e na

cinética da maturação nuclear até MII, o que poderia afetar o subsequente desenvolvimento embrionário. O oócito possui receptores para PDGF, EGF, insulina (Sirotkin et al., 1998) e o retinol desempenha papel importante no desenvolvimento embrionário precoce (Montagner et al., 1999; Montagner, 1999). A ação do retinol, fundamentalmente, é marcada pelo efeito antioxidante, evitando dessa forma a peroxidação lipídica da membrana celular (Dobreanu & Mody, 1997). Além disso, já foi determinada uma relação positiva entre o número de blastocistos obtidos e a suplementação do meio de maturação com PDGF associado a hormônios gonadotróficos (Harper & Brackett, 1993). Esse fator, na concentração de 0,1 ng/ml associado com FSH e LH nos meios de maturação, incrementa significativamente a produção de blastocisto (Harper & Brackett, 1993; Yang et al., 1993). Considerando esses dados como um todo, há evidências de efeito positivo do PDGF, insulina e retinol na maturação citoplasmática e conseqüente desenvolvimento embrionário, sem alterar a dinâmica do reinício da meiose.

Na ausência de soro e gonadotrofinas, o retinol e as associações PDGF-insulina-retinol e insulina-retinol, utilizados *in vitro* durante a maturação nuclear de oócitos bovinos, foram capazes de incrementar os índices de clivagem, quando comparados com o grupo-controle negativo (PVA; $P < 0,001$). No entanto, os oócitos não foram maturados adequadamente para atingirem níveis de clivagem semelhantes aos oócitos maturados na presença de soro fetal bovino, FSH e LH ($P < 0,001$; [Fig. 3](#)). Tendo em vista os índices de clivagem nos tratamentos não ultrapassarem os 20%, os embriões não foram cultivados até o estágio de blastocisto. Os FCs presentes no soro contribuem significativamente para o processo de maturação de oócitos (Lonergan et al., 1996). O IGF-I é um dos componentes do SFB com efeito estimulante no crescimento e na proliferação de células da granulosa *in vitro* (Singh et al., 1997), incrementando a expansão do *cumulus oophorus*, maturação citoplasmática e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro* (Armstrong et al., 1996; Funston et al., 1996; Yoshimura et al., 1996). Outro fator presente no soro é o EGF que estimula a maturação de oócitos em humanos, camundongos, bovinos e suínos. EGF e IGF-I, entre outros fatores

contidos no soro, afetam significativamente a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, incrementando os índices de fecundação (Lorenzo et al., 1993) e desenvolvimento embrionário *in vitro* (Palma et al., 1997). PDGF, insulina e retinol, apesar de terem participação na maturação de oócitos *in vitro* e conseqüente desenvolvimento embrionário, não são os únicos fatores presentes no soro; também participam desses processos hormônios de crescimento, esteróides e gonadotrofinas (Liu & Foote, 1995) com ação positiva na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos.

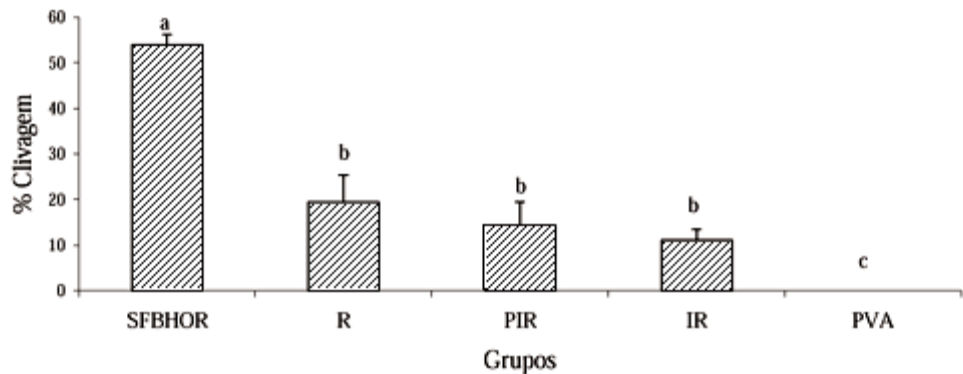


Figura 3. Efeito do retinol (R) e associações fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), insulina e retinol (PIR) e insulina e retinol (IR) durante a maturação de oócitos bovinos e suas conseqüências no índice de clivagem *in vitro*. As concentrações usadas de retinol, PDGF e insulina foram de 0,28µg/ml, 0,1 ng/ml e 0,12 UI, respectivamente. Nos grupos-controle positivo e negativo, os oócitos foram maturados, respectivamente, na presença de soro fetal bovino e gonadotrofinas (SFBHOR) ou no meio básico contendo álcool polivinílico (PVA). O resultado de cada grupo está representado em média e erro-padrão da média de seis replicações. Letras diferentes, acima de cada barra, representam diferenças significativas entre grupos ($P < 0,05$).

CONCLUSÕES

Em oócitos bovinos, o reinício da meiose não é afetado pela ação do PDGF, da insulina, do retinol e de suas interações. No entanto, a cinética da maturação nuclear é incrementada por ação da insulina e do PDGF. No início do desenvolvimento embrionário, a clivagem em meio quimicamente definido é afetada positivamente pelo retinol, insulina-retinol e PDGF-insulina-retinol, mas não atinge índices similares aos de oócitos maturados na presença de soro fetal bovino e hormônios gonadotróficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, D.T., XIA. P., GANNES, G. et al. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, v.54, p.331-338, 1996. [[Links](#)]
- DE LUCA, L.M. Retinoids and receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J.*, v.5 p.1924-2933, 1991. [[Links](#)]
- DOBREANU, M., MODY, E. Influence of natural antioxidants on *in vitro* lipoprotein oxidation. *Rom. J. Int. Med.*, v.35, p.55-62, 1997. [[Links](#)]
- DONAHUE, R. Maturation of the mouse oocyte *in vitro*. Sequence and timing of nuclear progression. *J. Exp. Zool.*, v.169, p.237-250, 1968. [[Links](#)]
- EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, v.208, p.349-351, 1965. [[Links](#)]
- FUNSTON, R.N., SEIDEL Jr., G.E., KLINDT, J. et al. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor- binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1390-1396, 1996. [[Links](#)]
- HADLEY, M.C. *Endocrinology*. 2.ed. Cap.12, 1988.Growth hormones.p.266-298, [[Links](#)]
- HARPER, K.M., BRACKETT,B.G. Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation *in vitro*. *Zygote*, v.1, p.27-34, 1993. [[Links](#)]
- HEYNER, S., SHAH, N., SMITH, R.M. et al. The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology*, v.39, p.151-161, 1993. [[Links](#)]

LIU, Z.M., FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.*, v.53, p.786-790, 1995. [[Links](#)]

LONERGAN, P., CAROLAN, C., LANGENDONCKT, A.V. et al. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.54, p.1420-1429, 1996. [[Links](#)]

LORENZO, P., ILLERA, M.J., SANCHEZ, J. et al. Bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro* with growth factors and estrous cow serum. *Theriogenology*, v.39, p.262, 1993. [[Links](#)]

MATSUI, M., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J. Vet. Med. Sci.*, v.57, p.1109, 1995. [[Links](#)]

MONTAGNER, M.M. *Meios congelados, hepes e retinol na produção de embriões in vitro em bovinos*. Santa Maria: UFSM, 1999. 79p. (Dissertação, Mestrado). [[Links](#)]

MONTAGNER, M.M., GONÇALVES, P.B.D, NEVES, J.P. et al., Retinol no desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro*. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.27, n.1, supl., p.265, 1999. [[Links](#)]

MORRIS-KAY, G.M., SOKOLOVA, N. Embryonic development and pattern formation. *Faseb J.*, v.10, p.961-968, 1996. [[Links](#)]

NONOGAKI, T., NODA, Y et al., Development blockage of mouse embryos caused by fatty acids. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.11, p.482-488, 1994. [[Links](#)]

PALMA, G., A, MÜLLER, M., BREM, G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, v.110, p.347-353, 1997. [[Links](#)]

PARIA, B.C., DEY, S.K. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Dev. Biol.*, v.87, p.4756-4760, 1990. [[Links](#)]

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., LEIBFREID-RUTLEDGE, M.L. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986. [[Links](#)]

ROMERO, A., OLSON, S.E., THOMAS, W.K. et al. Maturation of bovine oocytes in follicular fluid collected after the LH surge enhances subsequent embryonic development. *Biol. Reprod.*, v.44, suppl. 1, p.149, 1991. [[Links](#)]

ROSENKRANS Jr., C.F., ZENG, G.Q., McNAMARA, G.T. et al. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, v.49, p.459-462, 1993. [[Links](#)]

SAS *Statistical Analysis System*. v.6.03 Cary: SAS Institute, 1988. 1028p. [[Links](#)]

SCHEWEITZER, C.M. *Recuperação de espermatozoides, capacitação espermática e desenvolvimento embrionário in vitro de bovinos*. Santa Maria: UFSM, 1996. 101p. (Dissertação, Mestrado). [[Links](#)]

SINGH, B., ARMSTRONG, D.T. Insulin-like growth factor-I, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.56, p.1370-1375, 1997. [[Links](#)]

SIRARD, M.A., FLORMAN, H.M., LEIBFREID-RUTLEDGE, M.L. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v.40, p.1257-1263, 1989. [[Links](#)]

SIROTKIN, A.V., TARADAJNIK, T.E., MAKAREVICH, A.V. et al. Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.51, p.333-344, 1998. [[Links](#)]

SOPRANO, D. R., HARNISH, D. C., SOPRANO, K. J. et al. Correlations of RAR isoforms and cellular retinol-binding proteins mRNA levels with retinoid-induced teratogenesis. *J. Nutr.*, v.48, p.998-1005, 1993. [[Links](#)]

SUN, F.Z., MOOR, R.M. Nuclear-cytoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. *Dev. Biol.*, v.111, p.171-180, 1991. [[Links](#)]

SUSS, U., WUTHRICH, K., STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.38, p.871-880, 1988. [[Links](#)]

THIBAULT, C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent process? *J. Reprod. Fertil.*, v.51, p.1-15, 1977. [[Links](#)]

THIBODEAUX, J.K., DEL VECCHIO, R.P., HANSEL, W. Role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v.98, p.61-66, 1993. [[Links](#)]

TSAFRIRI, A., KRAICER, P. The time sequence of ovum maturation in the rat. *J. Reprod. Fertil.*, v.29, p.387-393, 1972. [[Links](#)]

VIGNOLA, A.H., PRADO, A., VALENTE, A. et al. Técnicas de coloração cromossômica para estágios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Ciênc. Rur.*, v.24, p.583-589, 1994. [[Links](#)]

WOLF, G. Multiple functions of vitamin A. *Physiol. Rev.*, v.64, p.873-936, 1984. [[Links](#)]

YANG, B.K., YANG, X., FOOTE, R.H. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, v.40, p.521-530, 1993. [[Links](#)]

YOSHIMURA, Y., ANDO, M., NAGAMATSU, S. et al. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. *Biol. Reprod.*, v.55, p.152-160, 1996 [[Links](#)]

YU, N., ROY, S. Developmental of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary *in vitro*: Effect of insulin. *Biol. Reprod.*, v.61, p.1558-1567, 1999. [[Links](#)]