

## EFEITO LUTEOTRÓFICO DE EMBRIÕES BOVINOS E DO ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA) EM CÉLULAS DA GRANULOSA CULTIVADAS *IN VITRO*.

### LUTEOTROPHIC EFFECT OF BOVINE EMBRYOS AND ARACHIDONIC ACID (AA) ON *IN VITRO* CULTURED GRANULOSA CELLS

R.M. Pereira, M.I. Vasques; T.P. Cunha; C.C. Marques, M.C. Baptista e A.E.M. Horta.  
Estação Zootécnica Nacional - INIA, Departamento de Fisiologia e Reprodução Animal, 2000  
Vale de Santarém

#### RESUMO

Pretendeu-se estudar a influência do AA e embriões na produção de progesterona (P4) pelas culturas de células da granulosa em monocamada. As concentrações de P4 (ng/mL) no meio de cultura de monocamadas de células da granulosa ao longo da cultura, com e sem AA e na presença (n=7) ou ausência (n=4) de embriões, foram doseadas por radioimunoensaio (RIA). Vinte e duas horas após a inseminação *in vitro* dos oócitos, os zigotos foram divididos em dois grupos e colocados nas monocamadas, prosseguindo o seu desenvolvimento até 12-13 dias de idade. No momento da transferência, as células da granulosa já tinham 2 dias de cultura suplementadas ou não com AA, tratamento que se manteve durante duas semanas.

Os resultados mostram que a introdução do AA no meio de cultura das células da granulosa não origina diferenças significativas na produção de P4 para cada dia de cultura (Dc) entre células tratadas e não tratadas. De facto, ao contrário do que acontece com a testemunha, onde a síntese desta hormona aumenta significativamente ao longo da cultura (3,3 e 41,9 ng/mL, em Dc0 e Dc14;  $P < 0,005$ ), nas células tratadas com AA, as concentrações de P4 não diferem entre si para qualquer dia de cultura (3,3 e 26,9 ng/mL, em Dc0 e Dc14;  $P > 0,05$ ). A presença de embriões em co-cultura com as células da granulosa aumenta significativamente a produção de P4 a partir de Dc4, quando comparado com a produzida pelas células da granulosa no mesmo dia de cultura sem embriões (33,6 vs. 61,9 ng/mL, em Dc4, respectivamente;  $P < 0,02$ ). Este aumento da produção de P4 também se verifica com a introdução dos embriões nas monocamadas de células da granulosa refrescadas com AA (20,3 vs. 46,3 ng/mL, em Dc4, respectivamente;  $P < 0,04$ ). A produção de P4 pelas células da granulosa na presença dos embriões apresenta uma curva bifásica com um aumento até Dc4-5, seguindo-se um período em que esta produção estabiliza, para voltar a aumentar a partir de Dc11 até ao fim da cultura. Este último aumento é menos pronunciado na presença de AA.

As células da granulosa em cultura diferenciam-se exibindo características de células lúteas. Esta luteinização é influenciada pela presença do AA e dos embriões. O AA diminuiu a capacidade de síntese de P4 por parte das células da granulosa. Os embriões apresentaram um efeito luteotrófico inequívoco traduzido por uma produção acrescida de P4 de acordo com o estadio de desenvolvimento embrionário. O atraso do desenvolvimento embrionário provocado pelo AA que conduz à diminuição da taxa de extrusados, origina a diminuição do 2º incremento de P4 correspondente à passagem de blastócito expandido para eclodido.

#### SUMMARY

It was evaluated the influence of AA and bovine embryos on progesterone production by *in vitro* cultured granulosa cells. Progesterone levels (ng/ml) in culture medium of granulosa cell monolayers, supplemented or not with AA with (n=7) or without (n=4) embryos, were measured by RIA throughout culture. Twenty two hours after *in vitro* insemination, ova were randomly allotted into two groups and transferred to monolayers of granulosa cells until day 12-13 of embryo development. At the moment of ova transfer, granulosa cell monolayers have been previously in culture for two days with or without AA supplementation. AA supplementation lasted for two weeks.

Results show that the addition of AA to culture medium of granulosa cell monolayers does not induce significant changes in progesterone production at any day of culture (Dc) when

compared to controls. However, progesterone synthesis significantly increases throughout culture in Control group (3,3 and 41,9 ng/ml at Dc0 and Dc14;  $P < 0,005$ ), but its levels do not significantly differ at each day of culture when cells are supplemented with AA (2,6 and 26,9 ng/ml, at Dc0 and Dc14;  $P > 0,05$ ). Co-culture of embryos with granulosa cells significantly increases progesterone levels in culture medium at Dc4, when compared to progesterone production by granulosa cells without embryos at the same day (33,6 vs. 61,9 ng/ml, at Dc4, respectively;  $P < 0,02$ ). This progesterone rise is also observed when embryos are transferred to monolayers of granulosa cells supplemented with AA (20,3 vs. 46,3 ng/ml, at Dc4, respectively;  $P < 0,04$ ). Progesterone production by granulosa cells co-cultured with embryos presents a biphasic curve, increasing from Dc0 to Dc4-5, maintaining its production from Dc4-5 to Dc11, and increasing again at Dc11 to the end of culture. This second increase in progesterone production is induced by embryo transition stage from expanded blastocyst to hatched blastocyst and is lower when culture is supplemented with AA.

*In vitro* cultured granulosa cells differentiate by exhibiting luteal cell properties. Luteinization of granulosa cells is affected by the presence of embryos and AA. AA has detrimental effects on progesterone production by granulosa cells. Luteotrophic influence of embryos is clearly confirmed by an increase in progesterone production by granulosa cells depending on the stage of embryo development. A delayed embryo development due to the presence of AA, associated with a lower hatched blastocyst rate, induces a lower second increase in progesterone production by granulosa cells *in vitro*.

## INTRODUÇÃO

As células da granulosa em cultura sofrem um processo de luteinização semelhante ao realizado, *in vivo*, quando da formação do corpo lúteo (CL) após a ovulação. Esta luteinização pode ocorrer independente das gonadotrofinas e na ausência de soro (Meidan *et al.*, 1990; Luck *et al.*, 1990), embora a sua presença acelere este processo (Kuran *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1997). O ácido araquidónico e seus metabolitos (prostaglandinas, HEPTES, HETES e leucotrienos) têm um papel regulador da função do CL, exercendo alguns destes metabolitos uma acção luteolítica e, outros, luteotrófica (Milvae *et al.*, 1986; Alila *et al.*, 1988a,b). Os embriões também têm um efeito luteotrófico e anti-luteolítico, que se manifesta *in vivo* pela manutenção do CL durante a gestação (Thatcher *et al.*, 1997). *In vitro*, este efeito permite aumentar a secreção de P4 pelas monocamadas de células da granulosa em cultura (Vasques *et al.*, 1998).

O objectivo do presente trabalho foi estudar qual a influência do AA e embriões na luteinização *in vitro* de células da granulosa bovinas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários foram recolhidos no matadouro e transportados para o laboratório numa solução de PBS (0,15% albumina sérica bovina e 0,05 mg/mL de kanamicina) a uma temperatura de 37° C para os ovários destinados à produção de embriões e de 4° C para os ovários destinados à recolha de células da granulosa utilizadas para a formação da monocamadas (Marques *et al.*, 1997). No laboratório procedeu-se à aspiração dos folículos com 2-6 mm de diâmetro para a obtenção dos complexos cumulus-oócitos e das células da granulosa. O líquido folicular aspirado dos ovários transportados a frio, após a recolha dos oócitos, foi centrifugado a 100 G durante 5 minutos para obtenção das células da granulosa. Após coloração (azul tripan a 0,4%) e contagem da suspensão celular, procedeu-se à diluição da células com TCM199 com 5% de soro de vaca superovulada em cio (SOCS) e antibiótico (ab), suplementado ou não com 100 µM de AA, de forma a obter uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. A cultura das células foi realizada em placa, colocando-se 8 gotas de 100 µL submersas em óleo mineral, durante 2 semanas na estufa incubadora a 39° C, com 5% de CO<sub>2</sub> e saturada de humidade, sendo refrescadas com meio de cultura (TCM199+10% SOCS+ab) suplementado ou não com 100 µM de AA.

A maturação e fertilização dos oócitos, assim como a cultura dos embriões foi realizada

segundo Pereira (2001). Os zigotos foram transferidos para as monocamadas de células da granulosa, 22 horas após a inseminação dos oócitos e, permaneceram em co-cultura até aos 12-13 dias de desenvolvimento. No momento da transferência, estas células já tinham 2 ou 3 dias de cultura.

Para caracterizar a produção de P4 pelas monocamadas de células da granulosa foram retiradas alíquotas (50 µl por gota) de meio de cultura das células da granulosa com e sem embriões sempre que se procedia ao refrescamento destas (Dc0, Dc2, Dc3, Dc4, Dc7, Dc8, Dc9, Dc10, Dc11 e Dc14) com meio de cultura onde foi incorporado ou não o AA. Foram instituídos 4 grupos: Grupo I - granulosa: granulosa sem embriões (4 repetições); Grupo II - GAA: granulosa com AA e sem embriões (4 repetições); Grupo III - Gran+emb: granulosa com embriões (7 repetições); Grupo IV - AAemb: granulosa com AA e embriões (7 repetições). As alíquotas recolhidas em todas as sessões foram congeladas a - 20° C para posterior doseamento da P4 por RIA, de acordo com o método descrito anteriormente por Vasques (1990) e Vasques *et al.* (1997). As concentrações foram determinadas a partir da média dos valores de duas réplicas por amostra, com base numa curva padrão estabelecida para valores previamente conhecidos em cada sessão de doseamento (8 pontos). O controlo de qualidade foi efectuado com base nos coeficientes de variação intra - (média dos coeficientes de variação dos duplicados das amostras observados em 10 sessões) e inter-ensaio (média dos coeficientes de variação de uma amostra conhecida - 5 ng/mL - observados em 10 sessões), os quais foram respectivamente de 2,7 e 2,84%. O SOCS utilizado nos meios de cultura apresentou uma concentração negligenciável de P4.

O tratamento estatístico para comparação das concentrações encontradas, entre grupos, para cada dia e, no mesmo grupo, entre dias, com as respectivas interações, baseou-se no modelo linear completamente casualizado, utilizando a análise de variância múltipla e análises de variância simples associadas ao método das menores diferenças significativas - LSD (ANOVA/MANOVA; StatSoft, Inc., 1995).

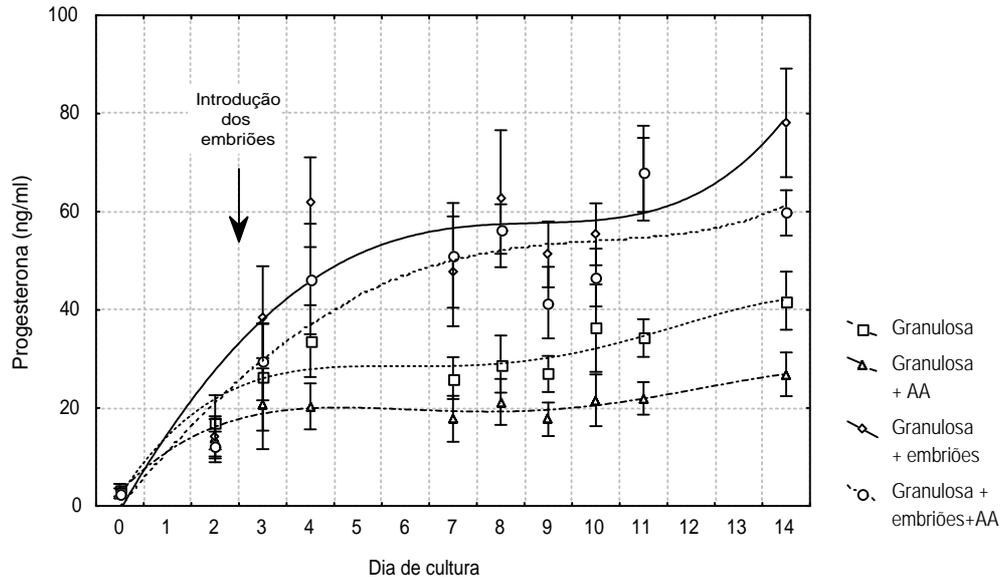
## RESULTADOS

A produção de P4 (quadros 1 e 2; figura 1) pelas células da granulosa cultivadas em monocamada variou de 3,26 ng /ml em Dc0 a 41,87 ng /ml em Dc14 (P=0,005). Esta produção com a introdução de AA no meio de cultura das células da granulosa variou de 3,26 ng /ml em Dc0 a 26,85 ng /ml em Dc14 (P=0,08). No entanto, as concentrações de P4 produzidas pelas células tratadas e não tratadas com AA não apresentam diferenças significativas entre si, considerando dias homólogos de cultura.

Quadro 1. Concentração (média±ep) de progesterona (ng/ml) ao longo da cultura de células da granulosa com e sem AA e na presença (n=7) ou ausência (n=4) de embriões (\* 2 repetições).

	Dc0	Dc2	Dc3	Dc4	Dc7	Dc8	Dc9	Dc10	Dc11	Dc14
<b>I-Granulosa</b>	3,26 ±1,65	17,05 ±7,31	26,25* ±18,81	33,62 ±9,67	26,08 ±5,68	28,94* ±10,95	26,94 ±4,89	36,29* ±16,71	34,26 ±5,09	41,87 ±7,81
<b>II-GAA</b>	3,26 ±1,65	13,93 ±5,04	20,86* ±16,06	20,32 ±6,16	17,79 ±6,17	21,23* ±8,81	17,67 ±4,53	21,55* ±9,87	21,95 ±4,37	26,85 ±5,88
<b>III-Gran+emb</b>	2,59 ±0,98	14,02 ±4,28	38,47 ±10,39	61,94 ± 9,15	47,84 ±9,15	62,63 ±13,95	51,30 ±6,69	55,41 ±6,32	67,53 ±7,55	78,09 ±11,06
<b>IV-AAemb</b>	2,59 ±0,98	12,03 ±3,12	29,40 ±7,84	46,29 ±12,17	51,09 ±12,17	56,47 ±5,05	41,44 ±6,36	46,56 ±6,36	67,83 ±9,67	59,76 ±4,6
<b>Anova LSD</b>	P>0,05	P>0,05	P>0,05	I-III: P=0,02 II-III: P=0,01 II-IV: P=0,04	I-III: P=0,07 I-IV: P=0,04 II-III: P=0,01 II-IV: P=0,006	I-III: P=0,03 I-IV: P=0,08 II-III: P=0,008 II-IV: P=0,02	I-III: P=0,05 II-III: P=0,006 II-IV: P=0,05	II-III: P=0,03	I-III: P=0,006 I-IV: P=0,006 II-III: P<0,001 II-IV: P=0,002	I-III: P=0,003 II-III: P=0,0004 II-IV: P=0,007 III-IV: P=0,08

**Figura 1. Influência do ácido araquidônico e embriões na produção de progesterona pelas monocamadas de células da granulosa.**



Embora não exista interação entre tratamentos e dias de cultura, a presença de embriões em co-cultura com as células da granulosa (quadros 1 e 3; figura 1) aumenta significativamente a produção de P4 a partir de Dc4, quando comparado com a produzida pelas células da granulosa no mesmo dia de cultura sem embriões, à exceção de Dc10. Este aumento da produção de P4 também se verifica com a introdução dos embriões nas monocamadas de células da granulosa refrescadas com AA. As produções de P4 pelas células da granulosa com embriões refrescadas com meio de cultura com e sem AA, não diferem estatisticamente entre dias homólogos de cultura, embora em Dc14 exista uma tendência ( $P=0,08$ ) para a produção de P4 ser inferior no grupo tratado.

Quadro 2. Comparação múltipla (valor expresso de P após LSD) das concentrações de P4 entre os dias de cultura. Acima da oblíqua granulosa sem embriões; abaixo da oblíqua granulosa sem embriões e com AA.

	Dc0	Dc2	Dc3	Dc4	Dc7	Dc8	Dc9	Dc10	Dc11	Dc14
Dc0		0,313	0,170	<b>0,027*</b>	0,096	0,126	0,184	<b>0,050*</b>	<b>0,024*</b>	<b>0,005*</b>
Dc2	0,435		0,583	0,226	0,509	0,477	0,469	0,250	0,208	0,070
Dc3	0,293	0,679		0,660	0,992	0,888	0,970	0,603	0,632	0,351
Dc4	0,213	0,640	0,974		0,581	0,780	0,630	0,873	0,963	0,550
Dc7	0,288	0,777	0,854	0,853		0,864	0,950	0,542	0,550	0,249
Dc8	0,283	0,662	0,985	0,956	0,837		0,905	0,704	0,751	0,440
Dc9	0,292	0,784	0,849	0,846	0,993	0,831		0,576	0,592	0,275
Dc10	0,275	0,649	0,971	0,941	0,822	0,987	0,817		0,903	0,739
Dc11	0,172	0,557	0,948	0,905	0,761	0,966	0,754	0,981		0,577
Dc14	0,086	0,345	0,721	0,633	0,507	0,737	0,502	0,752	0,720	

\*diferença significativa para  $P<0,05$  (MANOVA)

A produção de P4 pelas células da granulosa na presença dos embriões (quadros 1 e 3; figura 1) apresenta uma curva bifásica com um aumento até Dc4-5, seguindo-se um período em que esta produção estabiliza, para voltar a aumentar a partir de Dc11 até ao fim da cultura. Este último aumento é menos pronunciado na presença de AA.

Quadro 3. Comparação múltipla (valor expresso de P após LSD) das concentrações de P4 entre os dias de cultura. Acima da oblíqua granulosa com embriões; abaixo da oblíqua granulosa com AA e embriões.

	Dc0	Dc2	Dc3	Dc4	Dc7	Dc8	Dc9	Dc10	Dc11	Dc14
Dc0		0,269	<b>0,001*</b>	<b>0,000*</b>						
Dc2	0,361		<b>0,024*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,001*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>
Dc3	<b>0,013*</b>	0,107		<b>0,030*</b>	0,383	<b>0,026*</b>	0,234	0,116	<b>0,007*</b>	<b>0,000*</b>
Dc4	<b>0,000*</b>	<b>0,001*</b>	0,131		0,173	0,946	0,303	0,528	0,588	0,118
Dc7	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,045*</b>	0,655		0,153	0,738	0,463	0,058	<b>0,003*</b>
Dc8	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,012*</b>	0,344	0,602		0,273	0,485	0,636	0,136
Dc9	<b>0,000*</b>	<b>0,005*</b>	0,262	0,652	0,351	0,147		0,690	0,117	<b>0,010*</b>
Dc10	<b>0,000*</b>	<b>0,001*</b>	0,125	0,981	0,673	0,357	0,634		0,242	<b>0,029*</b>
Dc11	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,046*</b>	0,106	0,272	<b>0,011*</b>	<b>0,049*</b>		0,307
Dc14	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,005*</b>	0,211	0,401	0,750	0,077	0,220	0,435	

\* diferença significativa para  $P < 0,05$  (MANOVA)

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As células da granulosa aspiradas de folículos com 2-6 mm de diâmetro, cultivadas com SOCS formam monocamadas a partir de Dc2-3 e produzem P4 durante toda a cultura. A luteinização das células da granulosa *in vitro* verifica-se quer as células provenham de pequenos (<5 mm) ou de grandes folículos (Basini *et al.*, 1998) e origina células lúteas grandes, uma vez que as células lúteas pequenas derivam das células da teca (Alila e Hansel, 1984; Meidan *et al.*, 1990).

A introdução do AA no meio de cultura das células da granulosa não origina diferenças significativas na produção de P4 para cada dia de cultura entre células tratadas e não tratadas. No entanto, ao contrário do que acontece com a testemunha, onde a síntese desta hormona aumenta significativamente ao longo da cultura, nas células suplementadas com AA, não existem diferenças significativas nas concentrações de P4 entre quaisquer dos dias de cultura. O mecanismo de acção do AA nas células da granulosa luteinizadas ou nas células lúteas não é claro. Resultados de LaFrance e Hansel (1992) mostram que a suplementação *in vitro* de células lúteas com AA aumenta a secreção de P4 por estas células, quer sejam grandes ou pequenas. Esta situação difere *in vivo*, onde a infusão de AA na artéria ovárica induz a luteólise, com uma descida na síntese de P4 (Hansel e Fortune, 1978), o mesmo acontecendo com a administração directa do AA ao CL (Shemesh e Hansel, 1975). Por outro lado, Del Vecchio *et al.* (1994) verificaram que o AA pode afectar a secreção de P4 pelo CL bovino através da redução da secreção desta hormona pelas grandes células lúteas e/ou da inibição da sua produção pelas pequenas células lúteas em cultura. Estes autores atribuem esta acção à ocitocina, cuja libertação pelas grandes células lúteas também é estimulada pelo AA, ou a metabolitos da via da lipo-oxigenase com acção luteolítica. Células da granulosa obtidas por aspiração de folículos de mulheres submetidas a programas de IVF-ET cultivadas *in vitro* conseguem metabolizar o AA pelas vias da lipo- e ciclo-oxigenase, produzindo PGE1, PGE2, prostaciclina e HETES (Feldman *et al.*, 1986). As prostaglandinas referidas têm uma conhecida acção luteotrófica (Alila *et al.*, 1988a,b) e os hidroperóxidos resultam numa redução, dependente da dose, da secreção de P4 e de prostaciclina pelas células lúteas em cultura (Milvae *et al.*, 1986). A secreção destes metabolitos do AA com acções opostas na produção de P4 pode ser responsável pela ausência de diferenças significativas nesta produção, quando da suplementação da células da granulosa em cultura com e sem AA.

Os embriões bovinos produzem substâncias luteotróficas capazes de acelerar o processo de diferenciação das células da granulosa *in vitro*, desde o 2º ou 3º dias de idade (Vasques *et al.*, 1997, 1998). A produção de P4 pelas células da granulosa em co-cultura com embriões apresenta uma curva bifásica, com um aumento até Dc4-5, seguindo-se um período em que esta produção estabiliza, para voltar a aumentar a partir de Dc11 e até ao fim da cultura (Dc14). O 1º incremento de P4 reflecte o efeito de embriões com 2-3 dias de idade, enquanto que o 2º

incremento, a partir de Dc11, é devido ao efeito dos embriões com 9-10 dias de idade, correspondente à passagem de blastócito expandido para eclodido.

Os mecanismos fisiológicos que originam esta acção luteotrófica parecem diferir nos dois incrementos de P4 verificados, apresentando uma sincronia com o estadio de desenvolvimento embrionário. Esta acção resulta da produção de substâncias luteotróficas capazes de induzir a síntese de P4 pelas células em co-cultura, pois os jovens embriões bovinos não sintetizam P4 (Thibodeaux *et al.*, 1994). O 1º incremento de P4 aparece associado à acção dos embriões no estadio de 4-16 células. Shemesh *et al.* (1994) identificaram aumentos dramáticos na síntese de TNF $\alpha$  e de PGE2, substâncias conhecidas como luteotróficas, em jovens embriões com 48 horas de idade. Por outro lado, o PAF, sintetizado pelos embriões bovinos desde o estadio de 2 células (Stock e Hansel, 1992), embora não estimule a produção de P4 por células lúteas em cultura (Battista *et al.*, 1989), parece ter influência na luteinização das células da granulosa, aumentando a secreção de P4 por células da granulosa cultivadas *in vitro* (Rabinovici e Angle, 1991). O PAF actua, também, como estimulante da síntese de PDGF (Thibodeaux *et al.*, 1993). O PDGF é capaz de aumentar a produção *in vitro* de P4 pelas células lúteas (Battista *et al.*, 1989) e o gene e o receptor para este ligando estão presentes em todos os estadios de desenvolvimento dos embriões bovinos antes da eclosão (Watson *et al.*, 1992). Este factor de crescimento poderá contribuir para o aumento da síntese de P4 pelas células da granulosa verificado na presença dos embriões antes da eclosão da zona pelúcida.

O 2º incremento de P4 poderá ser da responsabilidade de outra substância segregada pelos embriões a partir do 7-8 dias de idade, o interferon  $\tau$  (Hernandez-Ledzema *et al.*, 1992). O interferon  $\tau$  tem uma acção luteotrófica pelo aumento da PGE2 e, antiluteolítica, pela diminuição da síntese de PGF2 $\alpha$  em explantes do endométrio (Helmer *et al.*, 1989a,b). Os interferons trofoblásticos modulam a produção de PGE2 pelas células do endométrio bovino *in vitro* pela indução do RNAm da COX-2, provocando um aumento de PGE2 no meio cultura destas células (Asselin e Fortier, 1997). Quando os meios de cultura de células da granulosa e embriões são suplementados com AA, este 2º incremento na produção de P4 é menos pronunciado, provavelmente devido ao atraso no desenvolvimento embrionário e diminuição da taxa de embriões extrusados induzidos pelo AA, pois a produção do interferon  $\tau$  pelos embriões cultivados *in vitro* está positivamente correlacionada com a qualidade e estadio de desenvolvimento. Esta síntese é superior nos embriões de melhor qualidade e em quantidades crescentes de acordo com o estadio de desenvolvimento: BL, BLE e EXT (Hernandez-Ledzema *et al.*, 1992, 1993).

As células da granulosa em cultura diferenciam-se exibindo características de células lúteas. Esta luteinização é influenciada pela presença do AA e dos embriões. O AA diminuiu a capacidade de síntese de P4 por parte das células da granulosa. Os embriões apresentaram um efeito luteotrófico inequívoco traduzido por uma produção acrescida de P4 em sincronia com o estadio de desenvolvimento embrionário. O atraso do desenvolvimento embrionário provocado pelo AA que conduz à diminuição da taxa de extrusados, origina a diminuição do 2º incremento de P4 correspondente à passagem de blastócito expandido para eclodido.

## BIBLIOGRAFIA

- Alila, H.W.; Hansel, W. 1984. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.*, 31: 1015-1025.
- Alila, H.W.; Dowd, J.P.; Corradino, R.A.; Harris, W.V.; Hansel, W. 1988a. Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. *J. Reprod. Fert.*, 82: 645-652.
- Alila, H.W.; Corradino, R.A.; Hansel, W. 1988b. A comparison of the effects of cyclooxygenase prostanoids on progesterone production by small and large luteal cells. *Prostaglandins*, 36: 259-270.
- Asselin, E.; Fortier, M.A. 1997. Trophoblastic interferons produced by the embryo modulates prostaglandin E2 (PGE2) production in bovine endometrial cells *in vitro* through induction of the cyclooxygenase-2 messenger. *Theriogenology*, 47: 305 abstr.
- Basini, G.; Baratta, M.; Ponderato, N.; Bussolati, S.; Tamanini, C. 1998. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reprod. Fert. Dev.*, 10: 471-478.

- Battista, P.J.; Alila, H.W.; Rexroad, C.E. Jr.; Hansel, W. 1989. The effects of platelet-activating factor and platelet-derived compounds on bovine luteal cell progesterone production. *Biol. Reprod.*, 40: 769-775.
- Del Vecchio, R.P.; Thibodeaux, J.K.; Randel, R.D.; Hansel, W. 1994. Interactions between large and small bovine luteal cells in a sequential perfusion co-culture system. *J. Anim. Sci.*, 73: 963-968.
- Feldman, E.; Haberman, S.; Abisogun, A.O.; Reich, R.; Levran, D.; Maschiach, S.; Zuckermann, H.; Rudak, E.; Dor, J.; Tsafriri, A. 1986. Arachidonic acid metabolism in human granulosa cells: evidence for cyclooxygenase and lipoxygenase activity *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 1: 353-356.
- Hansel, W.; Fortune, J.E. 1978. The applications of ovulation control. In: Control of ovulation. Crighton, B.D.; Haynes, G.R.; Foxcroft, C.; Lamming, G.E. (ed.), pp. 237-263. Butterwords. London-Boston.
- Hansel, W.; Fortune, J.E. 1978. The applications of ovulation control. In: Control of ovulation. Crighton, B.D.; Haynes, G.R.; Foxcroft, C.; Lamming, G.E. (ed.), pp. 237-263. Butterwords. London-Boston.
- Helmer, S.D.; Gross, T.S.; Newton, G.R.; Hansen, P.J.; Thatcher, W.W. 1989a. Bovine trophoblast protein-1 complex alters endometrial protein and prostaglandin secretion and induces an intracellular inhibitor of prostaglandin synthesis *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 87: 421-430.
- Helmer, S.D.; Hansen, P.J.; Thatcher, W.W.; Johnson, J.W.; Bazer, F.W. 1989b. Intrauterine infusion of highly enriched bovine trophoblast protein-1 complex exerts an antiluteolytic effect to extend corpus luteum lifespan in cyclic cattle. *J. Reprod. Fert.*, 87: 89-101.
- Hernandez-Ledezma, J.J.; Mathialagan, N.; Villanueva, C.; Sikes, J.D.; Roberts, R.M. 1993. Expression of bovine trophoblast interferons by *in vitro*-derived blastocyst is correlated with their morphological quality and stage of development. *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 1-6.
- Hernandez-Ledzema, J.J.; Sikes, J.D.; Murphy, C.N.; Watson, A.J.; Schultz, G.A.; Roberts, R.M. 1992. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by *in vitro* techniques. *Biol. Reprod.*, 47: 374-380.
- Kuran, M.; Broadbent, P.J.; Hutchinson, J.S. 1995. Follicle-stimulating hormone differentiation and progesterone production of bovine granulosa cells in culture. *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 237-249.
- LaFrance, M.; Hansel, W. 1992. Role of arachidonic acid and its metabolites in the regulation of progesterone and oxytocin release from the bovine corpus luteum. *P.S.E.B.M.*, 201: 106-113.
- Luck, M.R.; Rodgers, R.J.; Findlay, J.K. 1990. Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the *in vitro* differentiation of bovine granulosa cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2: 11-25.
- Marques, C.C.; Pereira, R.M.; Vasques, M.I.; Baptista, M.C.; Horta, A.E.M. 1997. Influência da refrigeração de ovários dadores na produção de embriões bovinos e cultura de células da granulosa *in vitro*. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, Estoril - 3 a 6 de Julho, vol. II, pp. 136-141.
- Meidan, R.; Girsh, E.; Blum, O.; Aberdam, E. 1990. *In vitro* differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. *Biol. Reprod.*, 43: 913-921.
- Milvae, R.A.; Alila, H.W.; Hansel, W. 1986. Involvement of lipoxygenase products of arachidonic acid metabolism in bovine luteal function. *Biol. Reprod.*, 35: 1210-1215.
- Pereira, R.M.; Vasques, M.I.; Marques, C.C.; Baptista, M.C.; Horta, A.E.M. 1997a. Efeito do soro de vacas em cio superovuladas sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos e a síntese de progesterona por monocamadas de células da granulosa. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, Estoril - 3 a 6 de Julho, vol. II, pp. 128-135.
- Rabinovici, J.; Angle, M.J. 1991. Platelet-activating factor induces progesterone secretion and changes in morphological appearance in luteinizing granulosa cells *in vitro*. *Fertil. Steril.*, 55: 1106-1111.
- Shemesh, M.; Gurevich, M.; Harel-Markowitz, E. 1994. Induction of cyclooxygenase and prostaglandin E2 production by bovine pre-embryos. *J. Reprod. Fert.*, abst.se. 13: 42 abst 126.
- Shemesh, M.; Hansel, W. 1975. Stimulation of prostaglandin synthesis in bovine ovarian tissues by arachidonic acid and luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 13: 448-452.
- StatSoft, Inc. 1995. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK.
- Stock, A.E.; Hansel, W. 1992. Assay of embryo-derived platelet activating factor (EDPAF) by an equine platelet aggregation assay: preliminary data concerning its presence in bovine embryo culture media. *Theriogenology*, 38: 757-768.
- Thatcher, W.W.; Binelli, M.; Burke, J.; Staples, C.R.; Ambrose, J.D.; Coelho, S. 1997. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology*, 47: 131-140.
- Thibodeaux, J.K.; Broussard, J.R.; Godke, R.A.; Hansel, W. 1994. Stimulation of progesterone production in bovine luteal cells by co-incubation with bovine blastocyst-stage embryos or trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 101: 657-662.
- Thibodeaux, J.K.; Del Vecchio, R.P.; Broussard, J.R.; Dickey, J.F.; Hansel, W. 1993. Stimulation of development of *in vitro*-matured and *in vitro*-fertilized bovine embryos by platelets. *J. Anim. Sci.*,

71: 1910-1916.

- Vasques, M.I. 1990. Doseamento de progesterona por radioimunoensaio (RIA): método da fase sólida. Relatório de actividades. Adenda. pp. 1-8. Vale de Santarém.
- Vasques, M.I.; Marques, C.C.; Pereira, R.M.; Baptista, M.C.; Horta, A.E.M. 1997. Efeito luteotrófico de embriões bovinos e de diferentes tipos de soros sobre células da granulosa cultivadas *in vitro*. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, Estoril - 3 a 6 de Julho, vol. II, pp. 155-164.
- Vasques, M.I.; Marques, C.C.; Pereira, R.M.; Baptista, M.C.; Horta, A.E.M. 1998. Efeito luteotrófico de embriões bovinos e de diferentes tipos de soros sobre células da granulosa cultivadas *in vitro*. Rev. Port. Cienc. Vet., 23: 25-30.