

EFEITO DO ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA) NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES EM CO-CULTURA COM CÉLULAS PLACENTÁRIAS.

EFFECT OF ARACHIDONIC ACID (AA) ON *IN VITRO* BOVINE EMBRYOS CO-CULTURED WITH PLACENTAL CELLS

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

RESUMO

O AA é o precursor dos eicosanóides, podendo ser metabolizado pelos embriões e células em co-cultura. Testou-se o efeito do AA em diferentes estadios do desenvolvimento de embriões bovinos cultivados em monocamadas de células trofoblásticas da placenta. Foram realizadas duas experiências em que se suplementou o meio de cultura com 100 μ M de AA utilizado para refrescar os embriões ao longo de toda a cultura (experiência 1) ou apenas até aos 3 dias de idade (Experiência 2). Em ambas as experiências, 22 horas após a inseminação *in vitro* dos oócitos (D0=dia da inseminação), os zigotos foram divididos em dois grupos (Exp. 1 - testemunha n=341 e PlacAA n=391; Exp. 2 - testemunha n=586 e PlacAAD3 n=576) e introduzidos nas monocamadas, prosseguindo o seu desenvolvimento até aos 12-13 dias de idade. No momento da transferência, as células placentárias já tinham uma semana de cultura com ou sem AA, continuando a suplementação com AA ao longo de toda a cultura na experiência 1 e, apenas até aos 10 ou 11 dias de cultura, na experiência 2.

Na experiência 1, a suplementação dos meios de cultura de embriões com AA não influenciou significativamente a taxa de embriões clivados, em D7 e D8. No entanto, diminuiu a qualidade dos embriões (mais embriões maus e menos médios que a testemunha) e a taxa de embriões extrusados ($P=0,06$) e atrasou o desenvolvimento embrionário. Para além do atraso verificado, o número total de embriões sofreu uma grande redução entre D7 e D10. Na experiência 2, a suplementação dos meios de cultura com AA até aos 3 dias de idade dos embriões aumentou significativamente a taxa de clivagem (65,4 vs. 71,7%, $P=0,02$), não havendo diferenças quanto às taxas e qualidade dos embriões, nem atraso no desenvolvimento embrionário.

O AA apresenta uma acção bifásica, positiva no desenvolvimento dos embriões até ao estadio de mórula, prejudicando o seu desenvolvimento posterior. Esta acção prejudicial verifica-se logo após o estadio de mórula, com uma grande redução da formação de blastócitos e blastócitos expandidos e ausência de embriões extrusados. A qualidade dos embriões também é reduzida. Os efeitos negativos do AA desaparecem quando este é adicionado apenas até ao 3º dia do desenvolvimento embrionário, sugerindo a síntese de algum ou alguns de seus metabolito(s), que embora benéficos para o início desse desenvolvimento, o prejudicam numa fase mais tardia.

SUMMARY

Arachidonic acid (AA) is a precursor of eicosanoids metabolized by embryos and cells in co-culture. It was evaluated the effect of AA on different stages of bovine embryo development co-cultured with placental trophoblastic cells. Embryo culture medium was supplemented with 100 μ M AA from Day 0 (D0) of embryo development to D13-D14 in Experiment 1, or from D0 to D3 of embryo development in Experiment 2. In both experiments, 22 hours after *in vitro* insemination, ova were randomly allotted into two groups (Exp. 1: Control group, n=341 and PlacAA, n=391; Exp. 2: Control group, n=586 and PlacAAD3, n=576) and transferred to monolayers of placental cells until day 12 or 13 of embryo development. At the moment of ova transfer placental cell monolayers have been previously in culture for seven days, supplemented or not with AA, and this supplementation continued to the end of culture in Exp. 1 or only to day 10-11 of cell culture in Exp. 2.

In Exp. 1, AA added to embryo culture medium did not significantly affected ova cleavage rate and embryo rates at D7 and D8. Nevertheless, later embryos showed lower quality rates (higher number of bad, and less medium quality embryos), lower extrusion rates ($P=0,06$) and delayed embryo development. Embryos from D7 to D10 also suffered a great reduction in number. In Exp. 2, AA supplementation from D0 to D3 of embryo development significantly increased ova cleavage rate (65,4% vs.71,7%, $P=0,02$), and no significant differences in embryo number and quality at D7-8 were found. Also, no delay in embryo development was showed in this experiment.

Arachidonic acid induces a biphasic effect on embryo development, positive from cleavage stage to morula, and a negative one from morula onwards. This detrimental effect is evident immediately after morula stage, as confirmed by a great reduction in blastocyst and expanded blastocyst production. Embryo quality is also reduced. These detrimental effects are neutralised when AA is added from day 0 to day 3 of embryo development. These results suggest that some of the AA metabolites, synthesised during *in vitro* culture, are beneficial to early embryos, although the same metabolites may have a detrimental effect on later stages of embryo development.

INTRODUÇÃO

A utilização de células em cultura para suporte do desenvolvimento embrionário *in vitro* é uma das estratégias mais praticadas pelos laboratórios de produção de embriões bovinos. No entanto, a co-cultura de embriões com células trofoblásticas da placenta é uma técnica pouco difundida e resultados do nosso laboratório apontam para a presença de factores no sistema de cultura destas células que beneficiam a fase inicial do desenvolvimento embrionário *in vitro*, factores esses ou outros entretanto sintetizados que, numa fase posterior, prejudicam esse desenvolvimento (Pereira et al., 1999a,b).

As células da placenta em cultura sintetizam prostaglandinas (PG) para o meio (Shemesh et al., 1979; Gross e Williams, 1988) e os embriões bovinos desde os estadios mais precoces do desenvolvimento conseguem metabolizar o AA (Shemesh et al., 1994; Lim e Hansel, 1996) e regular a secreção diferencial de PG pelas células do endométrio bovino em cultura (Tiemann et al., 1995), sendo possível que desequilíbrios na síntese das PG por parte das células placentárias cultivadas *in vitro*, estejam na origem deste efeito bifásico verificado no crescimento embrionário.

Neste trabalho, testou-se o efeito do AA em diferentes estadios do desenvolvimento de embriões bovinos cultivados em monocamadas de células trofoblásticas da placenta.

MATERIAL E MÉTODOS

A recolha de ovários e placentas bovinas foi realizada no matadouro de Santarém logo após o abate. As placentas destinados à obtenção de células para cultura foram transportadas para o laboratório em PBS a 4° C (0,15% de BSA+ 0,05 mg ml⁻¹ de kanamicina + 0,25 µg ml⁻¹ anfoterina B) e os ovários destinados à produção de embriões em PBS a 37° C.

Procedeu-se à digestão enzimática (0,25% tripsina em solução balanceada de Hank sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) dos cotilédones fetais para obtenção das células epiteliais trofoblásticas das placentas. Estas células, após coloração (corante vital – azul tripan a 0,4% e corante nuclear – lacmóide a 1% em ácido acético a 45° para diferenciar as células mono e binucleadas) e contagem, foram suspensas em meio de cultura (TCM199 + 10% de FCS + 100 UI de penicilina + 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina + 0,25 µg ml⁻¹ anfoterina B), suplementado ou não com 100 µM de AA, de forma a obter uma concentração de 5 x 10⁵ células ml⁻¹. Para a cultura das células placentárias em monocamada colocaram-se 8 gotas de 100 µl da suspensão celular em placa de Petri, submersas em óleo mineral, que permaneceram na estufa incubadora em ambiente saturado de humidade, com 5% CO₂ e a 39° C durante 3 semanas. Estas placas eram refrescadas com meio de cultura de 48 em 48 horas. Nos dias 8 ou 9 de cultura das células foram introduzidos os zigotos para a co-cultura e, o soro incorporado nos meios de cultura

utilizados para o resfriamento de células e embriões passou a ser o SOCS (Pereira et al., 1999a).

Para a produção dos embriões procedeu-se à recolha dos oócitos pela aspiração dos folículos com 2 a 6 mm de diâmetro de ovários transportados do matadouro a 37° C. Os complexos cumulus-oócitos aspirados foram colocados em meio de cultura (TCM199 + 10% SOCS + 100 UI de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina) dentro duma estufa incubadora a 39° C, com 5% de CO₂ e saturada de humidade durante 22 a 24 horas. Após este período, os oócitos maturados foram inseminados (D0=dia da inseminação) com sêmen bovino descongelado e submetido a um processo de swim-up em meio Talp. Os oócitos e espermatozóides permaneceram 22 horas no meio de fertilização (gotas de 40 µl com 10 oócitos em cada), após o que foram transferidos para as monocamadas de células placentárias onde ficaram 12 dias. Imediatamente antes da sua transferência, os oócitos inseminados foram submetidos a agitação no vórtex em solução de TCM199 com 0,1% de hialuronidase para retirar as células do cumulus e divididos em 2 grupos em ambas as experiências. No momento da transferência, as células placentárias já tinham uma semana de cultura com ou sem AA, continuando a suplementação com AA ao longo de toda a cultura na experiência 1 e, apenas até aos 10 ou 11 dias de cultura (Dc), na experiência 2.

Experiência 1. Efeito da adição de AA no desenvolvimento de embriões em co-cultura com monocamadas de células da placenta (6 réplicas).

Nesta experiência, adicionou-se 100 µM de AA em etanol (concentração final foi ajustada para não ultrapassar 0,1%) ao meio de cultura das células placentárias a partir de Dc0 e durante a co-cultura dos embriões. Foram constituídos 2 grupos de células placentárias em monocamada refrescadas com meio de cultura suplementado com AA (PlacAA; n=339) e, a testemunha, sem AA (testemunha, n=341).

Experiência 2. Efeito da adição de AA até os embriões atingirem 3 dias de idade, em co-cultura com monocamadas de células da placenta, no desenvolvimento embrionário (8 réplicas).

Nesta experiência, adicionou-se 100 µM de AA em etanol etanol (concentração final foi ajustada para não ultrapassar 0,1%) ao meio de cultura das células placentárias a partir de Dc0 e até Dc10-11, correspondendo à incorporação de AA durante a co-cultura dos embriões até aos 3 dias de idade. Foram constituídos 2 grupos de células placentárias em monocamada refrescadas com meio de cultura suplementado com AA até Dc10-11 (PlacAAD3; n=576) e, a testemunha, sem AA (testemunha, n=586).

Em ambas as experiências, foi avaliada a clivagem 24 horas após a transferência dos zigotos para as monocamadas e as taxas de embriões (mórulas e blastócitos) em D7 e D8 e de embriões extrusados em D12-13. A qualidade dos embriões em D8 foi avaliada através duma escala de 1 - Muito bom a 4 - Mau. A dinâmica do desenvolvimento embrionário foi estudada entre D7 e D10 e comparados os estádios de desenvolvimento (mórula - M, jovem blastócito - JBL; blastócito - BL; blastócito expandido - BLE, extrusado - EXT) entre grupos. O tratamento estatístico destes dados foi realizado pelo teste do qui-quadrado em tabelas de contingência 2x2, através da comparação dos valores obtidos em cada grupo no somatório de todas as réplicas (StatSoft, Inc., 1995).

RESULTADOS

Na experiência 1, a incorporação de AA no meio de cultura de embriões para o resfriamento das células trofoblásticas da placenta e embriões durante toda a co-cultura não influenciou significativamente as taxas de clivagem, de embriões em D7 e D8 nem extrusados, embora estes últimos apresentassem uma tendência (P=0,06) para valores inferiores ao grupo testemunha. Quando esta incorporação é realizada apenas até ao Dc10-Dc11 das células placentárias (experiência 2), correspondendo ao momento em que os embriões atingem 3 dias de idade, ela influencia positivamente (P=0,02) as taxas de clivagem, mas não interfere nas taxas de embriões em D7, D8 e EXT (quadro 1).

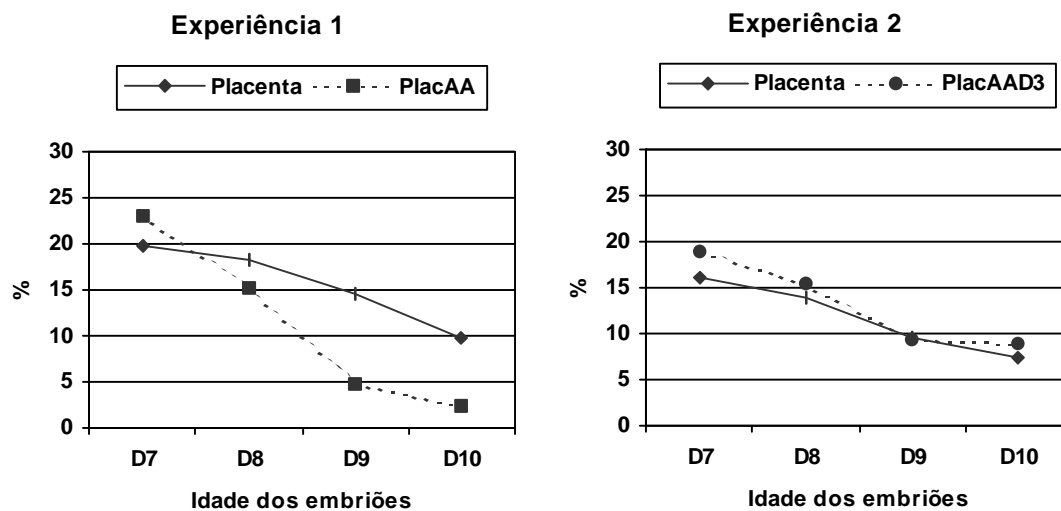
No grupo PlacAA verificou-se uma diminuição significativa da taxa de embriões em D7 de 23,1 para 15,14% em D8 ($\chi^2=5,151$, P=0,02), o que não aconteceu no grupo testemunha. Esta

tendência de redução da taxa de embriões mantém-se e acentua-se até ao fim da cultura, com apenas 2,39% em D10. Na experiência 2, esta situação não se verifica (figura 1).

Quadro 1. Efeito da suplementação do meio de cultura de embriões com AA ao longo de toda a cultura (experiência 1) ou até aos 3 dias de idade dos embriões (experiência 2) sobre a produção de embriões em co-cultura com células da placenta (Exp. 1, 6 réplicas; Exp. 2, 8 réplicas, excepto embriões EXT do grupo PlacAAD3 com 7 réplicas).

Grupos	Oócitos Insemin.	Embriões clivados		Embriões em D7		Embriões em D8		Embriões Extrusados	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%
Exp. 1									
Testemunha	341	253	74,19	50	19,76	46	18,18	4	8,09
PlacAA	339	251	74,04	58	23,1	38	15,14	0	0
Valor de P (χ^2)		P>0,05		P>0,05		P>0,05		P=0,06	
Exp. 2									
Testemunha	586	383	65,35	62	16,18	53	13,83	10	14,97
PlacAAD3	576	413	71,7	73	19,01	59	15,36	9	15,78
Valor de P (χ^2)		P=0,02		P>0,05		P>0,05		P>0,05	

Figura 1. Influência da suplementação com AA ao longo de toda a cultura (experiência 1) ou até ao terceiro dia dos embriões (experiência 2) no desenvolvimento embrionário.



Na experiência 1, a qualidade dos embriões em D8 (quadro 2) é inferior no grupo PlacAA, apresentando significativamente mais embriões de grau 4 e menos de grau 3 que a testemunha. Na experiência 2 não existem diferenças significativas na qualidade dos embriões em D8.

A suplementação dos meios de cultura com AA interfere na dinâmica do desenvolvimento dos embriões em co-cultura com células da placenta (quadro 3). Na experiência 1, embora não existam diferenças significativas entre grupos tratado e testemunha em D7, os embriões cultivados nas células placentárias refrescadas com AA encontram-se atrasados em D8, com significativamente mais mórulas e menos BL do que a testemunha. Este atraso mantém-se em D9, com mais BL e menos BLE que a testemunha. Em D10, o número de embriões no grupo PlacAA é muito reduzido e não existem diferenças significativas entre grupos. Para além do atraso no desenvolvimento verificado nos embriões cultivados com células placentárias e AA ao longo de toda a cultura, existe uma grande redução no número total de embriões entre D7 e D10 de, respectivamente, 58 para 6 embriões.

Quadro 2. Efeito da suplementação do meio de cultura de embriões com AA ao longo de toda a cultura (exp. 1) ou até aos 3 dias de idade dos embriões (exp. 2) sobre a qualidade dos embriões D8 (grau 1=muito bom...grau 4=mau; Exp.1, 6 réplicas; Exp.2, 8 réplicas).

Grupos	Qualidade dos embriões em D8 (%)			
	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Experiência 1				
Testemunha	0	2,17	23,91	73,91
PlacAA	0	0	0	100
Valor de P (χ^2)	P>0,05	P>0,05	P=0,004	P=0,001
Experiência 2				
Testemunha	0	3,77	18,87	77,35
PlacAAD3	1,7	0	16,95	81,35
Valor de P (χ^2)	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05

Quadro 3 Efeito da suplementação do meio de cultura de embriões com AA sobre a dinâmica do desenvolvimento embrionário em co-cultura com células da placenta (M=mórula, JBL=jovem blastócito, BL=blastócito, BLE=blastócito expandido, EXT=extrusado; Exp. 1, 6 réplicas).

<i>Dia 7</i>	(n)	M (%)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)	
Testemunha	50	70	20	6	4	
PlacAA	58	68,96	24,13	5,17	1,72	
Valor de P (χ^2)		P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
<i>Dia 8</i>	(n)	M (%)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)
Testemunha	46	13,04	34,78	36,95	15,21	0
PlacAA	38	55,26	23,68	15,78	5,26	0
Valor de P (χ^2)		P=0,001	P>0,05	P=0,03	P>0,05	P>0,05
<i>Dia 9</i>	(n)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)		
Testemunha	37	45,94	51,35	2,7		
PlacAA	12	83,33	16,66	0		
Valor de P (χ^2)		P=0,02	P=0,03	P>0,05		
<i>Dia 10</i>	(n)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)		
Testemunha	25	20	72	8		
PlacAA	6	33,33	66,66	0		
Valor de P (χ^2)		P>0,05	P>0,05	P>0,05		

Quando o AA é adicionado ao meio de cultura de embriões até aos 3 dias de idade, a dinâmica do desenvolvimento embrionário (quadro 4) não apresenta diferenças significativas em D7, mas em D8, o grupo testemunha tem significativamente mais BL que o grupo PlacAAD3. Em D9 existe um adiantamento nos embriões do grupo PlacAAD3, com significativamente menos BL e mais BLE que o grupo testemunha. Em D10, não se verificam diferenças significativas entre os dois grupos.

A redução do tempo de incorporação do AA de toda a cultura para apenas até ao terceiro dia do desenvolvimento embrionário permitiu anular a grande disparidade do número de embriões dos grupos tratado e não tratado nos diferentes dias de cultura (figura 1), apresentando mesmo em D10, o grupo PlacAAD3, mais embriões que a testemunha.

Quadro 4. Efeito do AA adicionado ao meio de cultura de embriões até aos 3 dias de idade sobre a dinâmica do desenvolvimento embrionário em co-cultura com células placentárias (M=mórula, JBL=jovem blastócito, BL=blastócito, BLE=blastócito expandido, EXT=extrusado; Exp. 2, D7 e D8 - 8 réplicas, D9 - 8 réplicas no grupo testemunha e 7 no grupo PlacAAD3 e D10 - 5 réplicas no grupo testemunha e 4 no grupo PlacAAD3).

<i>Dia 7</i>	(n)	M (%)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)	
Testemunha	62	69,35	12,9	11,29	6,45	
PlacAAD3	73	69,86	20,54	8,22	1,37	
Valor de P (χ^2)		P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	
<i>Dia 8</i>	(n)	M (%)	JBL (%)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)
Testemunha	53	7,54	35,85	33,96	22,64	0
PlacAAD3	59	15,25	47,46	16,94	20,33	0
Valor de P (χ^2)		P>0,05	P>0,05	P=0,03	P>0,05	P>0,05
<i>Dia 9</i>	(n)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)		
Testemunha	35	40,54	48,64	10,81		
PlacAAD3	34	33,33	54,54	12,12		
Valor de P (χ^2)		P=0,02	P=0,03	P>0,05		
<i>Dia 10</i>	(n)	BL (%)	BLE (%)	EXT (%)		
Testemunha	22	13,63	54,54	31,81		
PlacAAD3	26	15,38	65,38	19,23		
Valor de P (χ^2)		P>0,05	P>0,05	P>0,05		

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O AA é o precursor dos eicosanóides e a sua libertação da membrana citoplasmática pode constituir uma limitação ao início da sua cascata metabólica, pois apenas a forma livre é susceptível de ser metabolizada. Esta mobilização ou é realizada pela fosfolipase A2, Ca⁺⁺ dependente, que origina a libertação do AA directamente dos depósitos esterificados dos fosfolípidos membranários, ou pela hidrólise sequencial do fosfatidilinositol pelas fosfolipase C e diglicerolipase (Irvine, 1982; Shalev *et al.*, 1994). A suplementação dos SPZ bovinos com AA aumenta a síntese de PG (Shalev *et al.*, 1994), o mesmo acontecendo com os embriões bovinos (Lewis *et al.*, 1982). Estes embriões conseguem metabolizar o AA através da ciclo-oxigenase (COX) em PG (Lewis *et al.*, 1982; Shemesh *et al.*, 1994; Lim e Hansel, 1996). Não foram encontradas referências quanto à presença das lipo-oxigenases e epo-oxigenase capazes de metabolizar o AA, nos embriões bovinos com idade inferior a 13 dias.

A suplementação de 100 μ M de AA ao longo de toda a cultura de células placentárias e embriões leva a uma melhoria nas clivagens (experiência 2), mas prejudica o desenvolvimento ulterior dos embriões. Esta acção prejudicial verifica-se após o estadio de mórula, com grande redução da formação de BL e BLE e ausência de embriões extrusados. A qualidade dos embriões também é afectada negativamente pela presença do AA. Os efeitos negativos do AA nos embriões desaparecem quando este é adicionado apenas até ao 3º dia do desenvolvimento embrionário, sugerindo a síntese de algum ou alguns metabolito(s) do AA que, embora benéficos no início do desenvolvimento embrionário, o prejudicam numa fase mais tardia.

O benefício da presença de AA no meio de cultura de embriões na fase inicial do desenvolvimento embrionário é confirmada por Lim e Hansel (1996) que, adicionando 50 ng /ml de AA ao meio de cultura definido BECM, conseguiram aumentar significativamente o desenvolvimento dos embriões, após as 8 células e até ao estadio de mórula. Nesta experiência não foi conseguida a formação de BL com este tratamento. A metabolização do AA pelos embriões pode ser diferente de acordo com o seu estadio de desenvolvimento e também com a qualidade dos embriões produzidos. Shemesh *et al.* (1994) conseguiram detectar a COX em embriões bovinos com 48 horas, verificando depois uma descida abrupta nos níveis deste enzima na jovem mórula. A presença da COX nos embriões coincide com um aumento dramático na secreção de PGE2 e alguma PGF2 α , 48 horas após a fertilização *in vitro*. Às 72 horas após

esta fertilização, no estadio de jovem mórula, as concentrações de PGE2 entram em declínio e, as de PGF2 α , passam a ser indetectáveis (Gurevich e Shemesh, 1994; Shemesh *et al.*, 1994). Nadeau *et al.* (1994) avaliaram a capacidade de embriões bovinos D6, produzidos *in vitro*, sintetizarem PG, tendo verificado que a produção de PGE2 é superior nos embriões muito bons relativamente aos de menor qualidade, enquanto que os níveis de PGF2 α se mantêm inalterados. Estes trabalhos parecem reforçar a importância da predominância da PGE2 sobre a PGF2 α no início do desenvolvimento embrionário até ao estadio de mórula.

Os mecanismos subjacentes às acções do AA nos embriões podem ser vários e resultar, para além da utilização do AA pelos embriões, da sua metabolização pelas células trofoblásticas da placenta em co-cultura. Estas células em cultura produzem principalmente PGE2 e alguma PGF2 α (Shemesh *et al.*, 1984a; Gross *et al.*, 1987; Gross e Williams, 1988). Reimers *et al.* (1985) identificaram a produção de prostaciclina para além da PGE2. Esta predominância na síntese da PGE2 pelas células da placenta em cultura (Shemesh *et al.*, 1984; Gross *et al.*, 1987; Gross e Williams, 1988) pode ser responsável pelo efeito bifásico verificado no desenvolvimento embrionário *in vitro*, com bons resultados na primeira fase, da clivagem a jovens mórulas, mas piores a partir de D8. A suplementação com AA ao longo de toda a cultura destas células exacerba este efeito bifásico, provavelmente por aumento da síntese de PG. No grupo da placenta suplementado com AA verifica-se uma descida significativa na taxa de embriões de D7 para D8 (23,1 para 15,14%, P=0,02). Esta descida da taxa de embriões entre D7 e D8 também se verifica quando células da granulosa e embriões são suplementados com indometacina e PGE2 ou apenas PGE2, corroborando o envolvimento da PGE2 neste processo (Pereira, 2001).

Este trabalho demonstra que o AA apresenta uma acção bifásica, positiva no desenvolvimento dos embriões até ao estadio de mórula, prejudicando o seu desenvolvimento posterior. Esta acção prejudicial verifica-se logo após o estadio de mórula, com uma grande redução da formação de blastócitos e blastócitos expandidos e ausência de embriões extrusados. A qualidade dos embriões também é reduzida. Os efeitos negativos do AA desaparecem quando este é adicionado apenas até ao 3º dia do desenvolvimento embrionário, sugerindo a síntese de algum ou alguns de seus metabolito(s), provavelmente a PGE2, que embora benéficos para o início desse desenvolvimento, o prejudicam numa fase mais tardia.

BIBLIOGRAFIA

- Gross, T.S.; Williams, W.F. 1988. Bovine placental prostaglandins synthesis as modulated by binucleate cells. Biol. Reprod., 38: 1027-1034.
- Gross, T.S.; Williams, W.F.; Manspeaker, J.E.; Lewis, G.S.; Russek-Cohen, E. 1987. Bovine placental prostaglandin synthesis *in vitro* as it relates to placental separation. Prostaglandins, 34: 903-917.
- Gurevich, M.; Shemesh, M. 1994. Induction of cyclooxygenase and prostaglandin E production by the bovine pre-embryo. Reprod. Fertl. Dev., 6: 687 abst.
- Irvine, R.F. 1982. How is the level of arachidonic acid controlled in mammalian cells? Bioch. J.; 204: 3-16.
- Lewis, G.S.; Thaxter, W.W.; Bazer, F.W.; Curl, J.S. 1982. Metabolism of archidonic acid *in vitro* by bovine blastocyst and endometrium. Biol. Reprod., 27: 431-439.
- Lim, J.M.; Hansel, W. 1996. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized *in vitro* and cultured singly in a defined medium. Reprod. Fertl. Dev., 8: 1199-1205.
- Nadeau, Y.; Sirard, M.A.; Lacouline, L.; Fortier, M.A. 1994. Prostaglandins production as indicator of bovine embryo quality at early blastocyst stage. Theriogenology, 41: 263 abst.
- Pereira, R.M. 2001. Efeito de células em co-cultura e alterações induzidas na cascata metabólica do ácido araquidónico sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. Dissertação de Doutoramento apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. pp. 279.
- Pereira, R.M.; Marques, C.C.; Baptista, M.C.; Vasques, M.I.; Horta, A.E.M. 1999a. Caracterização duma cultura de células placentárias em monocamada para suporte do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Proceedings do IX Congresso de Zootecnia, A Zootecnia no Limiar do 3º Milénio. Porto, Exponor, 11 a 13 de Novembro, p. 136.

- Pereira, R.M.; Marques, C.C.; Baptista, M.C.; Vasques, M.I.; Horta, A.E.M. 1999b. Efeito do tipo e concentração de células em co-cultura na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Proceedings do IX Congresso de Zootecnia, A Zootecnia no Limiar do 3º Milénio*. Porto, Exponor, 11 a 13 de Novembro, p. 137.
- Reimers, T.J.; Ullmann, M.B.; Hansel, W. 1985. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol. Reprod.*, 33: 1227-1236.
- Shalev, Y.; Shemesh, M.; Levinshal, T.; Marcus, S.; Breitbart, H. 1994. Localization of cyclooxygenase and production of prostaglandins in bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 101: 405-413.
- Shemesh, M.; Milaguir, F.; Ayalon, N.; Hansel, W. 1979. Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocyst. *Theriogenology*, 56: 181-185.
- Shemesh, M.; Hansel, W.; Strauss, J.F.; Rafaeli, A.; Lavi, S.; Mileguir, F. 1984. Controle of prostanoid synthesis in bovine trophoblast and placentome. *Anim. Reprod. Sci.*, 7: 177-194.
- 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.
- StatSoft, Inc. 1995. *STATISTICA for Windows* [Computer program manual]. Tulsa, OK.
- Tiemann, U.; Davidson, J.A.; Hansen, P.J. 1995. Regulation of prostaglandin secretion and proliferation of bovine endometrial stromal cells by platelet-activating factor. *Reprod. Dom. Anim.*, 30: 141-143.