

ROLE OF PROSTAGLANDINS ON BOVINE OOCYTE MATURATION *IN VITRO*

Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M.

Departamento de Reprodução, Estação Zootécnica Nacional - INIA,
Vale de Santarém, Apartado 17, 2000 Vale de Santarém, Portugal

Summary:

The effect of prostaglandin E₂ (PGE₂, 1.4 x 10⁻⁸ M) and the inhibition of prostaglandin synthesis by a cyclooxygenase inhibitor (indomethacin, 28 μM) on *in vitro* bovine oocyte maturation was studied (total oocytes=2003). Drugs were added to the oocyte maturation medium. Oocyte maturation rate was determined 24 hours after culture by morphologic observation (Experiment 1, on 1488 oocytes: Control=469, PGE₂=521 and indomethacin=507, on 11 sessions).and confirmed in a smaller sample by nuclear staining with aceto-lacmoid of previously fixed oocytes (Experiment 2, with 515 oocytes: Control=164, PGE₂=179 and indomethacin=172, on 5 sessions). Matured oocytes from Experiment 1 were fertilised *in vitro* and co-cultured with granulosa cell monolayers until the hatching stage.

In experiment 1, both PGE₂ and indomethacin treatments significantly increased the oocyte maturation rate, when compared with control (90% and 86.1% vs. 80.1%; P≤0.0002 and P≤0.018, respectively). Differences between PGE₂ and indomethacin treatments are significant at a P level ≤ 0.097. These results were confirmed in Experiment 2 where oocyte maturation rates were significantly higher in PGE₂ and indomethacin (87.4% and 82.7% vs. 72.97%, respectively; P≤0.02). The PGE₂ treatment kept the tendency to be higher than indomethacin although at a less degree of significance. None of the parameters related with cleavage and embryo development showed any significant differences among groups.

Results above suggest that during bovine oocyte maturation *in vitro* some of the prostaglandins normally synthesised impair meiosis resumption. PGE₂ seems to stimulate this mechanism either by antagonising other arachidonate metabolites or directly enhancing the meiosis competence of treated oocytes.

EFEITO DAS PROSTAGLANDINAS SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS.

Marques, C.M., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M.

Departamento de Reprodução, Estação Zootécnica Nacional - INIA,
Vale de Santarém, Apartado 17, 2000 Vale de Santarém, Portugal

Resumo:

Foi determinado o efeito da prostaglandina E₂ ($1,4 \times 10^{-8}$ M) e da inibição da síntese das prostaglandinas (indometacina; 28 μ M) sobre a taxa de maturação *in vitro* de oócitos de bovino (n=2003). As drogas foram adicionadas ao meio de maturação dos oócitos. A taxa de maturação (24 horas após a cultura) foi avaliada por observação morfológica a pequena ampliação (Experiência 1, n=1488 oócitos: testemunha=469 em 10 sessões, PGE₂=512 e indometacina=507 em 11 sessões cada) e confirmada numa pequena amostragem por observação cromossómica através de coloração nuclear com aceto-lacmoid dos oócitos previamente fixados (Experiência 2, n=515 oócitos: testemunha=164, PGE₂=179 e indometacina=172 em 5 sessões cada). Os oócitos maturados foram fertilizados *in vitro* imediatamente após o processo de maturação seguindo o seu desenvolvimento em co-cultura com células da granulosa até à fase de embriões extrusados. Os resultados da taxa de fertilização e produção de embriões em diferentes fases de crescimento foram comparados entre os tratamentos instituídos no meio de maturação.

Na Experiência 1, os oócitos tratados com PGE₂ e indometacina apresentaram uma taxa de maturação significativamente superior ao grupo testemunha (90% e 86,1% vs. 80,1%; $P \leq 0,0002$ e $P \leq 0,018$, respectivamente). Pelo teste de comparações múltiplas (LSD) verifica-se que existe uma forte tendência para as taxas de maturação no grupo PGE₂ serem superiores às do grupo indometacina ($P \leq 0,097$). Estes resultados são confirmados na Experiência 2 pela pequena amostragem submetida a coloração nuclear. Este método confirmou que a taxa de maturação obtida no grupo testemunha é significativamente inferior à dos grupos tratados com PGE₂ e indometacina (72,97% vs. 87,41% e 82,7%, respectivamente; $P \leq 0,02$). O grupo tratado com PGE₂ manteve a tendência para ser superior ao da indometacina, embora de forma menos expressiva do que a evidenciada pela avaliação morfológica. Nenhum dos parâmetros relacionados com a clivagem e desenvolvimento embrionário mostrou diferenças significativas entre os tratamentos efectuados.

Os resultados sugerem que durante o processo de maturação de oócitos bovinos *in vitro* são sintetizadas prostaglandinas que inibem a meiose. Por outro lado é sugerido que a PGE₂ estimula este mecanismo, quer antagonizando a acção de outros metabolitos do ácido araquidónico quer estimulando directamente a competência meiótica dos oócitos tratados.

Trabalho financiado pelos projectos 221/96/PIDDAC e PRAXIS/3.2/AGR/01/94

Introdução

A produção de embriões bovinos a partir de óocitos obtidos por aspiração folicular e cultivados *in vitro* (IVM, IVC) atinge apenas uma taxa de sucesso de 30 a 40% (Hyttel et al., 1997). Este êxito limitado pode ser atribuído não só à população heterogénea de óocitos obtidos dos folículos de 2 a 8 mm, normalmente seleccionados para o efeito, como à existência de condições não ideais durante a sua maturação *in vitro*.

A maturação do óocito implica a realização de dois programas celulares complementares, a maturação nuclear com reinício da meiose e a maturação citoplasmática, compreendendo uma série de alterações estruturais e moleculares destinadas a suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário consequentes. A indução hormonal do processo é fisiologicamente atribuída à descarga pré-ovulatória da LH, que gera uma cascata de factores endócrinos e parácrinos que afectarão a referida maturação.

Vários destes factores, entre eles hormonas, factores de crescimento e citoquinas, têm sido adicionadas ao meio de maturação para aumentar a competência meiótica e citoplasmática dos óocitos bovinos (Bever et al., 1997). Na ovelha, os folículos pré-ovulatórios sintetizam prostaglandinas (PGs) em resposta à descarga de LH (Murdoch et al., 1986). A prostaglandina E₂ (PGE₂) tem também sido implicada no processo de maturação óocitária, na ovelha (Downs e Longo, 1983) e na ratinha (Tsafiriri, 1972; Murdoch, 1988). A expansão e dispersão das células do cumulus durante o processo de maturação, na ratinha, parece envolver a PGE₂ (Eppig, 1981; Sallustri et al., 1985). No entanto, o exacto mecanismo da sua acção sobre a maturação é ainda desconhecido. Não existem dúvidas quanto ao envolvimento das prostaglandinas no processo da ovulação, embora o papel da PGE₂ seja menos claro que o da PGF_{2α}. As prostaglandinas parecem influenciar também a motilidade espermática, a reacção acrosómica e as taxas de penetração e de fertilização no rato e no homem (Viggiano et al., 1995).

Poucos estudos *in vitro* referem a acção da PGE₂ sobre o processo de maturação de óocitos bovinos (Krogenaes et al., 1993). O objectivo do nosso trabalho foi o de determinar o efeito da suplementação em PGE₂, adicionada ao meio de cultura dos óocitos, sobre a respectiva taxa de maturação assim como o efeito de um inibidor da síntese das prostaglandinas, a indometacina, relativamente ao mesmo parâmetro. Os resultados das taxas de fertilização e produção de embriões em diferentes fases de crescimento foram também comparados entre os tratamentos instituídos no meio de maturação.

Materiais e Métodos

Colheita de óocitos: Os ovários foram transportados para o laboratório imediatamente após o abate dos animais em solução salina - fosfatada tamponizada (PBS) a 37°C. A esta solução foram adicionados albumina sérica bovina (BSA, Fracção V, SIGMA, 0,3%, w/v) e antibióticos (Kanamicina, SIGMA, 0,05 mg/ml). O líquido folicular foi aspirado de folículos entre 2 a 8 mm de diâmetro com seringa e agulha de 19 G e colocado em tubos de fundo cónico contendo líquido de recolha e lavagem de óocitos (TCM-199, GibCo), suplementado com 5% de soro de vaca em cio superovulada (v/v) e antibióticos (solução de 100 U/ml de penicilina e de 100 µg/ml de estreptomicina). Após decantação, o resíduo foi observado à lupa para selecção de conjuntos de óocitos e células do cúmulus (COC) compactos, seguindo apenas para cultura os óocitos que exibiam um revestimento completo e com ooplasma uniforme.

Experiência1.

Os oócitos seleccionados foram transferidos para placas de Petri contendo 3 ml de meio de maturação (TCM - 199) suplementado com 10% de soro de vaca em cio superovulada (v/v), antibióticos (solução de 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e algumas células da granulosa em suspensão, sendo divididos aleatoriamente em três grupos diferentes: TESTEMUNHA (n=469 oócitos, num total de 10 sessões); PGE₂ (n=512 oócitos, num total de 11 sessões), sendo esta substância adicionada ao meio de maturação anteriormente descrito na dose de $1,4 \times 10^{-7}$ M (Gurevich, 1993) e INDOMETACINA (n= 507 oócitos em 11 sessões), na dose de 28 µM de acordo com Okuda et al. (1995). A maturação realizou-se em estufa a 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ saturada de humidade durante 22 a 24 horas. Após este período, apenas os oócitos evidenciando clara expansão das células do cumulus seguiram para a fertilização, sendo inseminados (1×10^6 spz/ml) com sêmen de bovino descongelado e submetido a um processo de capacitação *in vitro* em meio TALP com cafeína (485,5 µg/ml). O processo de fertilização realizou-se em gotas de 40 µl durante 22 horas. Nesta altura foram transferidos para o meio de cultura de embriões (100 µl) contendo células da granulosa em monocamada com 48 horas de cultura. Quarenta e oito horas depois da fertilização *in vitro* se ter iniciado, procedeu-se à verificação e contagem dos oócitos clivados, que prosseguiram o seu desenvolvimento *in vitro* até à fase de extrusão. O efeito dos três tipos de tratamento dos oócitos foi comparado relativamente à sua maturação, clivagem após a fertilização *in vitro*, taxas de embriões obtidos ao 8º dia e de embriões extrusados, utilizando a análise de variância (StatSoft inc., 1995).

Experiência2.

Nesta experiência foram processados 515 oócitos, divididos nos três grupos descritos anteriormente (Testemunha=164, PGE₂=179 e Indometacina=172, em 5 sessões cada). Após a maturação *in vitro*, as células do cumulus foram removidas completamente dos oócitos por pipetagens sucessivas e vortex. Os oócitos nus foram incubados durante 10 minutos numa solução hipotónica de citrato de sódio (1%) à temperatura ambiente e fixados numa solução de ácido acético:metanol (1:3) durante 72 horas. Procedeu-se à observação dos oócitos fixados e corados com acetolacmoid em microscópio em contraste de fase para verificação da configuração cromossómica. Os oócitos foram divididos em dois grupos: maturados, correspondendo ao estadio nuclear de metafase II, e não-maturados, incluindo os estadios de vesícula germinal (GV), cromossomas condensados (CC II), diacinese e telofase I. O efeito dos três tipos de tratamento utilizados foi comparado relativamente à maturação do oócito utilizando a análise de variância (StatSoft inc., 1995).

Resultados

Na tabela 1 podemos observar que os oócitos tratados com PGE e indometacina apresentaram uma taxa de maturação significativamente superior ao grupo testemunha (90% e 86,1% vs 80,1%; $P \leq 0,0002$ e $P \leq 0,018$, respectivamente). Pelo teste de comparações múltiplas (LSD) verifica-se que existe uma forte tendência para as taxas de maturação no grupo PGE₂ serem superiores às do grupo indometacina ($P \leq 0,097$).

Tabela 1. Efeito da inibição da síntese das prostaglandinas e da PGE₂ sobre a maturação de oócitos bovinos *in vitro* (observação morfológica com pequena ampliação).

	nº sessões	% de maturação	Comparação múltipla (P, LSD)*		
		Média ± dp	Test.	PGE ₂	Ind.
Testemunha	10	80,1 ^a ± 7,2	-----	0,0002	0,018
PGE ₂	11	90,0 ^b ± 3,5	0,0002	-----	0,097
Indometacina	11	86,1 ^b ± 5,0	0,018	0,097	-----
ANOVA		p ≤ 0,001			

Médias com sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (ANOVA-LSD).

* nível de probabilidade das menores diferenças significativas encontradas entre tratamentos.

Estes resultados são confirmados pela pequena amostragem submetida a coloração nuclear (n=5, tabela 2). Este método confirmou que a taxa de maturação obtida no grupo testemunha é significativamente inferior aos grupos tratados com PGE₂ e indometacina (72,97% vs 87,41% e 82,7%, respectivamente; P≤0,02) A maturação oocitária no grupo tratado com PGE₂ continua a mostrar tendência para ser superior à do grupo da indometacina, embora de forma menos expressiva do que a evidenciada pela avaliação morfológica.

Tabela 2. Efeito da inibição da síntese das prostaglandinas e da PGE₂ sobre a maturação de oócitos bovinos *in vitro* (observação microscópica com coloração nuclear).

	nº sessões	% de maturação	Comparação múltipla (P, LSD)*		
		Média ± dp	Test.	PGE ₂	Ind.
Testemunha	5	72,97 ^a ± 5,54	-----	0,007	0,05
PGE ₂	5	87,41 ^b ± 5,24	0,007	-----	0,31
Indometacina	5	82,70 ^b ± 9,59	0,05	0,31	-----
ANOVA		p ≤ 0,02			

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em relação à percentagem de clivagem (taxa de fertilização), à taxa de embriões entre D7 e D10, nem em relação à taxa de embriões eclodidos (Tabelas 3 e 4). Estes resultados mostram que os tratamentos instituídos durante a maturação oocitária não influenciaram as fases posteriores de produção de embriões *in vitro*.

Tabela 3. Influência dos tratamentos sobre a percentagem de embriões clivados e seu desenvolvimento aos 7 (D7) e 8 (D8) dias de idade.

	nº sessões	Clivados	D7	D8
		média ± dp	média ± dp	média ± dp
Testemunha	10	76,0 ± 10,2	22,3 ± 6,8	25,7 ± 9,3
PGE ₂	11	76,3 ± 9,6	17,9 ± 6,0	20,0 ± 8,7
Indometacina	11	73,0 ± 11,5	19,8 ± 5,9	19,5 ± 6,1
ANOVA		P>0,05	P>0,05	P>0,05

Clivados: percentagem de oócitos maturados que fertilizaram (48h)

Tabela 4. Influência dos tratamentos sobre a percentagem de embriões aos 9 (D9) e 10 (D10) dias de idade, e sobre a taxa de blastocitos extrusados.

	nº sessões	D9	D10	Extrusados
		média ± dp	média ± dp	média ± dp
Testemunha	10	27,3 ± 8,7	28,0 ± 8,9	52,9 ± 29,2
PGE ₂	11	20,1 ± 9,5	20,4 ± 9,7	46,4 ± 29,7
Indometacina	11	20,1 ± 6,0	21,1 ± 7,1	63,2 ± 19,7
ANOVA		P>0,05	P>0,05	P>0,05

D7-D10: Percentagem de embriões relativamente ao número de clivados

Extrusados: Percentagem de blastocitos que eclodiram

Discussão

Os resultados indicam que, nas condições normais de cultura *in vitro* de oócitos, existe a síntese de um ou vários prostanóides que prejudicam a maturação do oócito, uma vez que a inibição da ciclooxigenase aumentou significativamente a percentagem de oócitos maturados. Por outro lado, a PGE₂ parece exercer um efeito estimulante da maturação, quer por antagonismo da acção de outros prostanóides prejudiciais (a confirmarem-se os resultados deste trabalho), quer estimulando directamente a meiose.

O tipo de participação das prostaglandinas na maturação do oócito não é muito claro. A exposição de oócitos de ratinha à PGE₁ resultou na inibição da meiose no estágio de anafase I, entre as 7 e as 12 horas após a incubação (Cho, 1976). A PGE₂ aumenta o número de oócitos de ratinha que iniciam a maturação em cultura, enquanto a PGF_{2α} não altera esse número (Neal et al., 1975). Segundo Murdoch (1988), a administração sistémica de indometacina na ovelha, cerca de 8 horas após o pico de LH, impediu a dissociação das células do cumulus e consequentemente bloqueou o reinício da meiose. A acção inibidora da indometacina foi anulada pela injeção intra-folicular de PGE₂ às 12 horas, enquanto a PGF_{2α} não contrariou o efeito da indometacina.

Krogenaes et al. (1993), ao adicionarem anti-inflamatórios não-esteróides, como a fenilbutazona e o flunixin-meglumine, ao meio de maturação de oócitos bovinos suplementado com 20% de soro de feto bovino, observaram um decréscimo significativo da expansão do cumulus e do número de oócitos que atingiram a maturação. Estes autores não põem de lado um possível efeito tóxico dos agentes utilizados explicado pela relação dose-dependente encontrada relativamente à inibição da meiose.

Um aumento da síntese de PGs após a estimulação gonadotrófica foi demonstrada em várias espécies, nomeadamente na ovelha (Murdoch et al., 1986) e na ratinha (Tsafri e Dekel, 1994) onde este aumento foi associado ao estímulo da isoforma da ciclooxigenase, a prostaglandina endoperoxido-sintetase (PGS-2, actualmente conhecida como COX-2) nos folículos pré-ovulatórios (Morris e Richards, 1995). Foi demonstrada a existência de PGE₂-9-cetoreductase, enzima que converte a PGE₂ em PGF_{2α}, nos tecidos ováricos (Watson et al., 1979). Na ovelha, é possível que a progesterona aumente a actividade folicular deste enzima no momento da ovulação (Murdoch et al., 1986). Quantidades mensuráveis de PGE₂ e de TNFα (Tumor Necrosis Factor α) são segregadas nas primeiras 24 horas de cultura de oócitos bovinos,

enquanto a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é indetectável neste período (Gurevich e Shemesh, 1994). Segundo Schuetz e Dubin (1981) tanto a progesterona como as prostaglandinas são libertadas para o meio de cultura *in vitro* de COC's da ratinha, sendo a proporção de PGE/PGF de 7:6.

Os trabalhos citados realizados noutras espécies concordam com o efeito estimulante da PGE_2 sobre a maturação oocitária por nós observado. Por outro lado, as concentrações mais elevadas de PGE_2 no meio de maturação de oócitos bovinos encontradas por Gurevich e Shemesh (1994), reforçam esta tese. A PGE_2 parece exercer um efeito directo sobre a maturação oocitária visto que este grupo evidenciou uma forte tendência para estimular aquele processo quando comparado com o grupo tratado com a indometacina ($p=0.097$). Para alguns autores o efeito das prostaglandinas sobre a maturação é independente do seu efeito sobre a dissociação celular (Kronegaes et al., 1993), verificando-se um efeito directo sobre a meiose.

Porém, existe uma contradição entre os nossos resultados e os de outros autores, quer *in vivo* quer *in vitro*, relativamente ao efeito dos inibidores da ciclooxigenase sobre a maturação do oócito. Os efeitos opostos constatados podem dever-se a diferenças da constituição dos meios de cultura, com especial referência aos soros e células incorporadas. A adição de soro superovulado e de células da granulosa ao meio de maturação dos oócitos, segundo a metodologia por nós adoptada (Pereira et al., 1997), poderá levar à síntese de quantidades excessivas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou outros prostanóides pelos complexos cumulus-oócitos, que possam ser prejudiciais à maturação oocitária numa fase tão precoce. Não é de excluir a possibilidade das diferenças encontradas em relação ao trabalho de Krogenaes et al. (1993) se deverem à selectividade de diferentes anti-inflamatórios não esteróides na inibição preferencial da ciclooxigenase 1 (COX1) ou 2 (COX2) (Robertson, 1995, Kurumbail et al., 1996), havendo indicações na ratinha de um predomínio desta última na altura da ovulação (Tsafiriri e Dekel, 1994).

Os tratamentos realizados durante a fase de maturação oocitária, não evidenciaram efeitos ulteriormente no processo de fertilização nem de desenvolvimento embrionário. Porém, estudos na ratinha revelam que a inibição da síntese de Pgs durante a fertilização reduz significativamente a taxa de clivagem (Viggiano et al., 1995) e que nos bovinos a PGE_2 estimula a fertilização *in vitro* (Gurevich et al., 1993).

Bibliografia

- Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Van den Hurk, R., Izadyar, F. (1997). Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47: 13-22.
- Cho, W.K. (1976). The effects of prostaglandin E-1 and F2- α on maturation of mouse oocytes *in vitro*. *J.Reprod. Fertil.*, 47(1):1-5.
- Downs, S.M., Longo, F.J. (1983). Effect of indomethacin on oocyte maturation in mice. In: Greenwald GS, Terranova PF (eds): "Factors regulating ovarian function" New York; Raven Press, pp. 65-69.
- Eppig, J.J. (1981). Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol. Reprod.*, 25: 191-195.
- Gurevich, M., Harel-Markowitz, E., Marcus, S., Shore, S., Shemesh, M. (1993). Prostaglandin production by the oocyte cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the development of the early bovine embryo. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5: 281-283.

- Gurevich, M., Shemesh, M. (1994). Induction of cyclooxygenase and prostaglandin E2 production by the bovine pre-embryo. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6 (6): 687-691.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47: 23-32.
- Krogenaes, A., Ropstad, E., Hafne, A. L. (1993). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the maturation and fertilization media on bovine oocytes. *Theriogenology*, 40: 1029-1038.
- Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Syegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C., Stallings, W.C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384:644-648.
- Morris, J.K., Richards, J.S. (1995). Luteinizing hormone induces prostaglandin endoperoxide synthase-2 and luteinization in vitro by A-Kinase and C-Kinase pathways. *Endocrinology*, 136(4):1549-1558.
- Murdoch, W.J. (1988). Disruption of cellular association within the granulosa compartment of periovulatory ovine follicles: relationship to maturation of the oocyte and regulation by prostaglandins. *Cell Tissue Res.*, 252(2):459-462.
- Murdoch, W.J., Peterson, T.A., van Kirk, E.A., Vincent, D.L., Inskoop, E.K. (1986). Interactive roles of progesterone, prostaglandins and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Reprod.*, 35: 1187-1194.
- Neal, P., Baker, T.G., McNatty, K.P., Scaramuzzi, R.J. (1975). Influence of prostaglandins and human gonadotrophin on progesterone concentration and oocyte maturation in mouse ovarian follicles maintained in organ culture. *J. Endocrinol.*, 65(1):19-25.
- Okuda, K., Venoyama, Y., Miyamoto, A., Okano, A., Schweigert, F., Schams, D. (1995) Effects of prostaglandins and oestradiol 17- β on oxytocin binding in cultured bovine luteal cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 1045-1051.
- Pereira, R.M., Vasques, M.I., Marques, C.C., Batista, M.C., Horta, A.E.M. (1997). 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, 3-6 Julho, Estoril.
- Robertson, P. (1995). Molecular regulation of prostaglandin synthesis. Implications for endocrine systems. *TEM*, 6: 293-297.
- Schuetz, A.W., Dubin, N.H. (1981). Progesterone and prostaglandin secretion by ovulated rat cumulus cell-oocytes complexes. *Endocrinology*, 108(2):457-463.
- Tsafiriri, A., Dekel, N. (1994). Molecular mechanisms in ovulation. In: "Molecular biology of the female reproductive system". Ed. J.K. Findlay, Academic press inc. USA, pp. 207-258.
- Tsafiriri, A., Lindner, H.R., Zor, U., Lamprecht, S.A. (1972). In vitro production of meiotic division in follicle enclosed rat oocytes by LH, c AMP and PGE2. *J. Reprod. Fertil.*, 31: 39-50.
- Viggiano, J.M., Herrero, M.B., Cebral, E., Boquet, M.G., Gimeno, M.F. (1995). Prostaglandin synthesis by cumulus-oocyte complexes: effects on in vitro fertilization in mice. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 53:261-265.
- Watson, J., Shepherd, T.S., Dodson, K.S. (1979). Prostaglandin E2-9- Ketoreductase in ovarian tissues. *J.Reprod. Fertil.*, 57:489-496.