

LUTEOTROPHIC EFFECT OF BOVINE EMBRYOS AND DIFFERENT SERA SUPPLEMENTATION ON GRANULOSA CELL MONOLAYERS *IN VITRO*.

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

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

Abstract:

Progesterone (P4) concentrations were measured in the culture medium of granulosa cell monolayers with embryos (15 repetitions; 892 *in vitro* fertilised embryos - IVF), or without co-cultured embryos (18 repetitions) and supplemented with oestrous cow serum after superovulation (SOCS). P4 was radioimmunoassayed on 50 µl media pools reconstituted from individual culture drops by the time of the medium refreshments. The 24h old IVF embryos were joined to granulosa cells with 48h of culture. The same protocol was implemented with culture media supplemented with oestrus cow serum after spontaneous heat (OCS) but in a small number of repetitions (n=5).

In the SOCS group, progesterone concentrations in the medium without embryos rose significantly from day zero to day 4 of culture, and from then to day 14 there was only a slight consistent increase. In the group containing embryos, progesterone levels rose significantly from day 0 to day 4, then the concentrations stabilised until day 9, there was a second significant rise in day 11 with no further increase onwards. The average P4 concentrations in the media containing embryos on days 4, 7, 9, 11, and 14 of culture were significantly higher than their homologous in the group without embryos, the difference being 21.7, 19.6, 18.7, 35.2 and 35.1 ng/ml respectively (P<0.01). Each of the embryos joined to the co-culture media induced a marked luteinizing effect on granulosa cells which was confirmed by a rise in P4 secretion, positive and significantly dependent on the age of the embryo ($Y = -0,098 + 0,042.X$, $r = 0,975$; $P < 0,01$). Each embryo provoked a P4 rise equivalent to 0.02, 0.15, 0.28 and 0.34 ng/ml for 2.5, 7, 9, and 10 days old embryos, respectively. In the OCS group only a non biphasic pattern on P4 synthesis under the presence of embryos was observed. Progesterone synthesis by granulosa cells co-incubated with embryos was significantly higher in SOCS than OCS group on days 2, 9, 11, and 14 of culture.

Results above show that granulosa cells cultured *in vitro* become luteinized, probably due to the stimulus of LH and other luteotrophic agents that are present in oestrous cow serum added to the culture medium. This luteinization process is further stimulated by the presence of co-cultured IVF embryos. This embryo-mediated luteinizing effect on granulosa cell monolayers is highly correlated with the age of the embryo, the higher stimulus on progesterone production being observed when expanded and hatched blastocysts are present. Oestrous serum from superovulated cows significantly increased the embryo-mediated effect on progesterone output when compared to serum from cows with spontaneous heat.

EFEITO LUTEOTRÓFICO DE EMBRIÕES BOVINOS E DE DIFERENTES TIPOS DE SOROS SOBRE CÉLULAS DA GRANULOSA CULTIVADAS *IN VITRO*.

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

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

Sumário:

Foram doseadas as concentrações médias de progesterona (P4) contidas no meio de cultura de células da granulosa em monocamada com embriões (15 repetições; 892 embriões fertilizados *in vitro* - FIV) ou sem embriões (18 repetições) e suplementado com soro de vaca em cio após superovulação (SOCS). A progesterona foi doseada por RIA de pools de 50 µl de meio de cultura constituídos a partir de cada gota no momento do refrescamento destas ao longo da cultura. Os embriões foram introduzidos na co-cultura às 24 horas após a FIV, altura em que as células da granulosa já se encontravam em cultura há dois dias. O mesmo protocolo foi executado com meios suplementados com soro de vaca em cio natural (OCS) e os seus efeitos comparados com o grupo SOCS.

Nos meios suplementados com SOCS, a concentração de P4 durante a cultura de monocamadas de células da granulosa sem embriões aumentou acentuadamente desde o dia zero até ao 4º dia e de forma menos acentuada até ao dia 14. No grupo da co-cultura (células da granulosa + embriões) verificou-se um aumento significativo até ao dia 4, uma estabilização até ao dia 9 e de novo um aumento acentuado e significativo no dia 11, mantendo-se estável até ao 14º dia. No grupo da co-cultura, as concentrações médias de P4 nos dias 4, 7, 9, 11 e 14 de cultura foram significativamente superiores às suas homólogas do grupo sem embriões em 21,7, 19,6, 18,7, 35,2 e 35,1 ng/ml, respectivamente ($P < 0,01$). Cada embrião colocado no meio de cultura provocou um acentuado efeito luteinizante sobre as células da granulosa, que se traduziu por um aumento da síntese de P4 significativamente dependente da idade dos embriões ($Y = -0,098 + 0,042.X$, $r = 0,975$; $P < 0,01$). O efeito estimulante de cada embrião na produção de P4 traduziu-se em 0,02, 0,15, 0,28 e 0,34 ng/ml respectivamente aos 2,5, 7, 9 e 10 dias de idade. O efeito estimulante dos embriões sobre a produção de P4 quando o meio foi suplementado com OCS, não apresentou a característica bifásica observada no grupo SOCS. O estímulo à síntese de P4 pelos embriões foi significativamente superior no grupo suplementado com SOCS ao 2º, 9º, 11º e 14º dias de cultura.

Os resultados apresentados evidenciam que as células da granulosa, quando colocadas em cultura *in vitro* sofrem um processo de luteinização provavelmente devido ao estímulo da LH e outros factores luteinizantes contidos no soro de vaca em cio que é adicionado ao meio. Por outro lado, este processo de luteinização é potencializado quando se juntam embriões fertilizados em co-cultura. O estímulo luteinizante dos embriões sobre as células da granulosa acentua-se com o estadio de desenvolvimento embrionário, verificando-se o maior estímulo quando os embriões se encontram nas fases de blastocito expandido e de extrusão. Este efeito estimulante dos embriões na produção de P4 é significativamente superior nos meios suplementados com SOCS.

Trabalho parcialmente financiado pelo projecto PRAXIS/3.2/AGR/01/94

Introdução

Os estudos sobre a participação do embrião na manutenção da gestação passam pela identificação de efeitos antiluteolíticos (inibição da luteolise) e luteotróficos (aumento da síntese de progesterona pelo corpo lúteo). Os estudos *in vivo* têm-se baseado na identificação do efeito antiluteolítico pela instilação intra-uterina de homogenados de embriões de diferentes idades. Nos bovinos, a duração da vida do corpo lúteo está dependente da libertação da PGF2 α a partir do útero, e os sinais de reconhecimento da gestação sintetizados pelo trofoblasto actuam de uma forma paracrínica de modo a impedir a síntese de PGF2 α pelo endométrio (Thatcher et al., 1997). O efeito luteotrófico embrionário tem sido estudado através do incremento da produção de progesterona provocado em células do corpo lúteo cultivadas *in vitro* (Thibodeaux et al., 1994). Os resultados apresentados por Mann e Lamming (1995) são consistentes com a hipótese de vacas com baixos teores de progesterona durante a fase luteínica do ciclo produzirem sinais luteolíticos mais fortes, estando por isso predispostas a uma maior mortalidade embrionária. Sabendo-se que o embrião por si só não é capaz de sintetizar progesterona (Thibodeaux et al., 1994), neste trabalho pretende-se estudar o efeito de embriões de diferentes idades (de 1 a 14 dias) sobre a produção daquela hormona por parte de monocamadas de células da granulosa co-cubadas *in vitro*, em meios de cultura suplementados com soros de vacas em cio sujeitas (SOCS) ou não (OCS) a tratamento superovulatório prévio.

Material e métodos

Para se testar o efeito luteotrófico dos embriões sobre as células da granulosa em co-cultura *in vitro*, realizaram-se os seguintes passos experimentais:

- 1 - Comparação da produção de progesterona (P4) entre culturas em monocamada de células da granulosa na ausência e na presença de embriões. Este objectivo foi estudado em duas experiências, tendo por base a suplementação dos meios de cultura com SOCS (soro de vacas em cio com tratamento superovulatório) ou com OCS (soro de vaca em cio sem superovulação).
- 2 - Efeito do número e idade dos embriões na produção de P4 (nos grupos SOCS)
- 3 - Comparação da produção de P4 entre os grupos OCS e SOCS, ambos na presença de embriões.

Os ovários foram recolhidos em matadouro e transportados para o laboratório no prazo máximo de duas horas e trinta minutos. Após a recolha, os ovários foram colocados em garrafa térmica contendo uma solução de PBS com albumina sérica bovina (BSA, 0,15% p/v) e sulfato de kanamicina (0,05 mg/ml). Durante o transporte, os ovários dadores de oócitos foram acondicionados à temperatura de 37 °C, e os dadores de células da granulosa a 4 °C.

A cultura de oócitos e das células da granulosa em monocamadas foi descrita anteriormente (Marques et al., 1997). A concentração inicial das células da granulosa foi ajustada a 1×10^6 por ml. Em trabalho de rotina realizado no nosso laboratório, verifica-se que a concentração de células vivas durante o período de cultura apresenta flutuações não correlacionadas com o dia de cultura. A recolha e processamento dos soros OCS e SOCS,

utilizados na suplementação dos meios de cultura, foram descritos anteriormente (Pereira et al., 1997).

A fertilização e cultura de embriões *in vitro* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Marques et al. (1997). Os embriões foram colocados em co-cultura 22 horas após a fertilização *in vitro* correspondendo ao 2º dia da cultura das células da granulosa, tendo aí permanecido durante 13 dias.

A progesterona (P4), doseada por RIA em fase sólida (Vasques, 1990), apresentou concentrações negligenciáveis em ambos os soros, antes de serem adicionados aos meios de cultura. Esta hormona foi doseada ao longo da cultura nos dias 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14, a partir de amostras de 50 µl retiradas durante o refrescamento dos meios e as concentrações encontradas para cada dia foram comparadas entre os grupos, por análise de variância (StatSoft inc., 1995). As amostras foram filtradas e armazenadas à temperatura de -20 °C até ao seu doseamento. 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 dos doseamentos 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 dos duplicados de uma amostra conhecida observados em 10 sessões), os quais foram respectivamente de 2,7% e de 2,84%.

As experiências referidas utilizaram um mínimo de 4 e um máximo de 18 réplicas, de acordo com os valores apresentados nos resultados.

Resultados

Na tabela 1 podemos observar a diferença das concentrações da progesterona entre culturas de células da granulosa na ausência ou na presença de embriões (grupo SOCS). Como consequência da introdução de embriões (24 horas pós-fertilização) no 2º dia da cultura das células da granulosa, verifica-se um estímulo à produção de progesterona detectado a partir de D4. Este aumento significativo da concentração de progesterona manteve-se ao longo do período estudado.

Tabela 1. Efeito da presença de embriões na produção de progesterona durante a co-cultura com células de granulosa (SOCS).

	Concentração de P4 (ng/ml) durante a cultura das células (os embriões são colocados ao 2º dia)						
	D0 (n)	D2 (n)	D4 (n)	D7 (n)	D9 (n)	D11 (n)	D14 (n)
	média±ep	média±ep	média±ep	média±ep	média±ep	média±ep	média±ep
Sem embriões	(8) 2,8 ± 0,74	(17) 19,4 ± 3,9	(18) 31,3 ± 3,8	(18) 28,7 ± 3,0	(17) 33,8 ± 4,1	(18) 40,2 ± 3,7	(18) 47,7 ± 4,6
Com embriões	(8) 2,8±0,39	(10) 22,9 ± 5,7	(14) 53,0 ± 6,1	(14) 48,3 ± 6,4	(15) 52,5 ± 5,1	(15) 75,4 ± 9,5	(15) 82,8 ± 9,2
ANOVA: F=	0,004	0,268	9,72	8,91	8,52	13,67	12,96
P=	0,95	0,609	0,004	0,006	0,007	0,0008	0,001

A concentração de progesterona sobe significativamente em ambos os grupos do D0 até ao D4 da cultura. Entre o 4º dia e D9 as concentrações em ambos os grupos estabilizam, para voltarem a subir em D11. Este aumento em D11 é significativamente superior no grupo em co-cultura com embriões. Na ausência de embriões, este segundo aumento da P4 só é significativo ao 14º dia de cultura (Tabela 2, Figura 1).

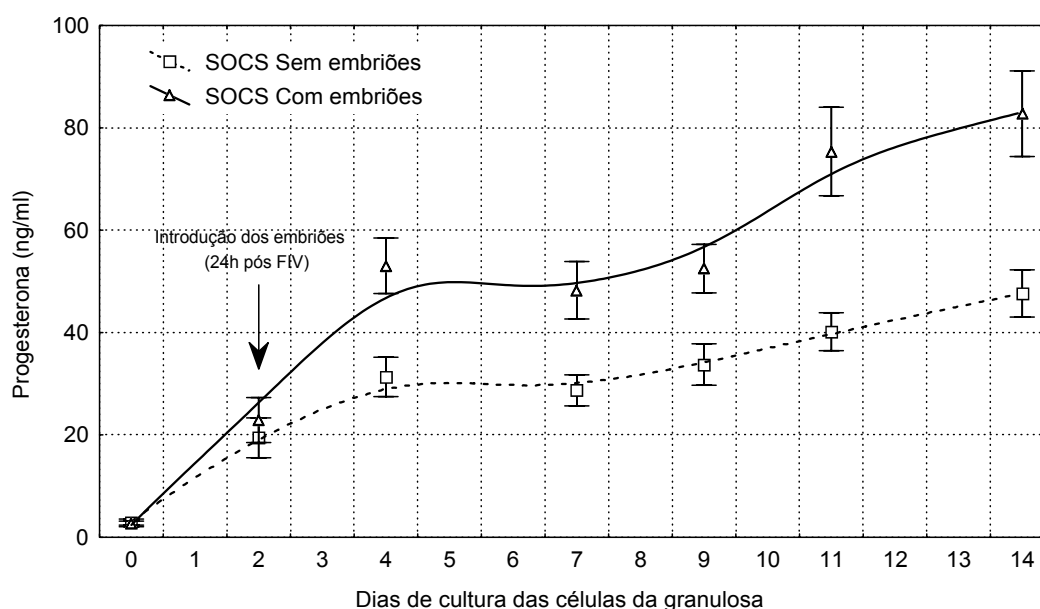
Tabela 2. Comparação múltipla (valor expresso de P após LSD) das concentrações de P4 entre os dias de cultura. Acima da oblíqua: grupo sem embriões; abaixo da oblíqua: grupo com embriões (SOCS).

	D0	D2	D4	D7	D9	D11	D14
D0		0.01562*	0.00005*	0.00019*	0.00001*	0.00000*	0.00000*
D2	0.11276		0.02785*	0.08539*	0.00936*	0.00018*	0.00000*
D4	0.00005*	0.00735*		0.61757	0.65043	0.09612	0.00245*
D7	0.00021*	0.02323*	0.63471		0.34526	0.03149*	0.00048*
D9	0.00005*	0.00763*	0.95446	0.66995		0.23273	0.01054*
D11	0.00000*	0.00001*	0.02592*	0.00724*	0.02028*		0.15741
D14	0.00000*	0.00000*	0.00337*	0.00074*	0.00241*	0.44750	

* diferença significativa para $P < 0,05$

Conforme se pode constatar na figura 1, a produção de progesterona durante a cultura SOCS + embriões apresenta um crescimento bifásico (um aumento até ao 4º dia seguido de novo incremento no 11º dia). No grupo sem embriões este segundo incremento da P4 é mais atenuado.

Figura 1. Efeito luteinizante de embriões em co-cultura com células da granulosa suplementados com soro de vacas superovuladas (média \pm ep).



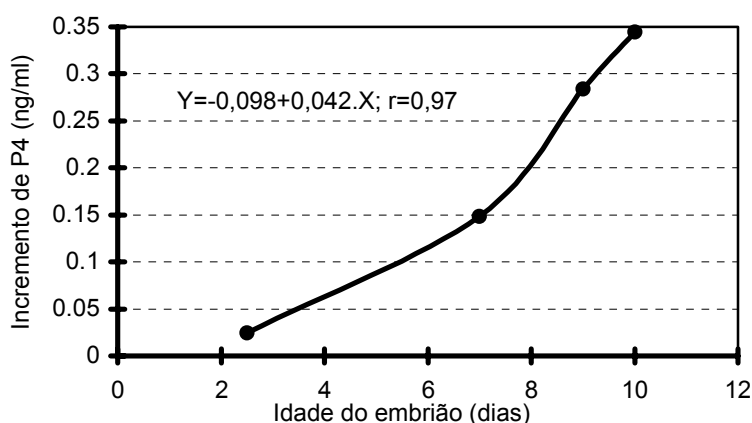
Como se pode constatar na tabela 3, o número de embriões ao longo do período da cultura diminuiu enquanto que a diferença na produção progesterona relativamente ao grupo sem

embriões, subiu durante o mesmo período. Isto permitiu constatar que o estímulo de cada embrião sobre a produção de P4 pelas células da granulosa está altamente correlacionado com o estadio de desenvolvimento embrionário ($r=0,975$; $P<0,001$), como se pode observar na Figura 2.

Tabela 3. Aumento de produção de P4 pelas células da granulosa em co-cultura, sob o efeito da presença de embriões (efeito etário e unitário), suplementados com SOCS.

	Dia de cultura da monocamada da granulosa			
	DC4	DC9	DC11	DC14
Aumento da produção de P4 (ng/ml)	21.71	18.72	35.21	35.11
nº de embriões responsáveis	892	126	124	102
Estímulo de cada embrião (ng/ml)	0.0243	0.149	0.284	0.344
Idade do embrião (dias)	2.5	7	9	10
idade do embrião / aumento de P4: $Y = -0,098 + 0,042.X$				
Correlação: $r = 0,975$; $P < 0,001$				

Figura 2. Contribuição de cada embrião, de acordo com a sua idade, no incremento de P4 pelas células da granulosa (SOCS).



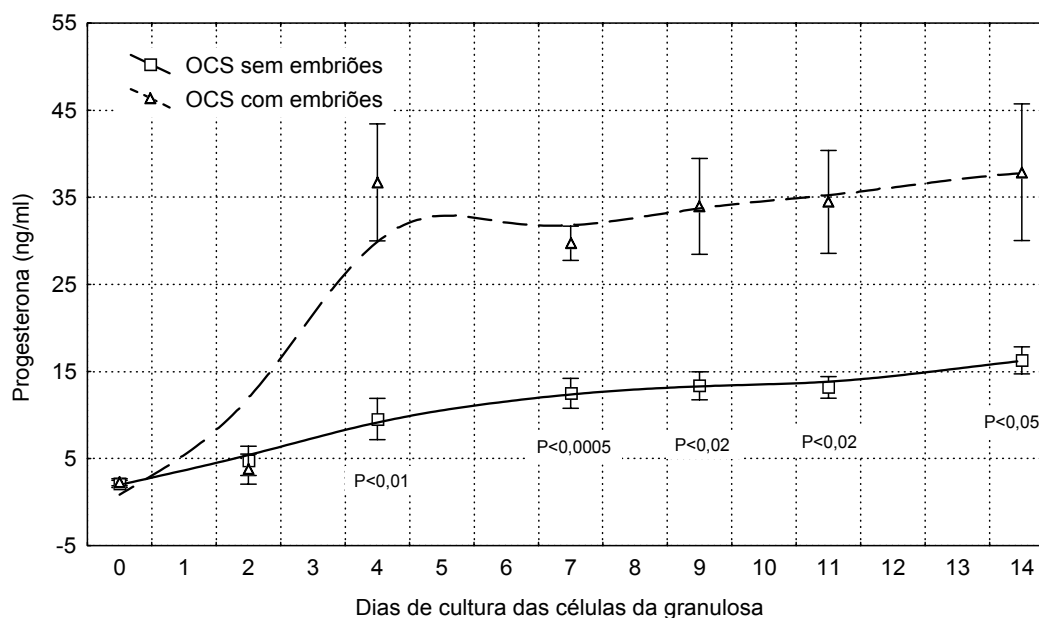
Quando os meios são suplementados com soro de vacas em cio não submetidas a tratamento superovulatório, o efeito luteinizante dos embriões é ainda mais marcado como se pode observar na Tabela 4 e Figura 3.

Tabela 4. Influência da presença de embriões na produção de P4 pelas células da granulosa com meios de cultura suplementados com soro de vaca em cio natural (OCS).

	Concentração de P4 (ng/ml) durante a cultura das células (os embriões são colocados ao 2º dia)						
	D0	D2	D4	D7	D9	D11	D14
	média±ep	média±ep	média±ep	média±ep	média±ep	média±ep	média±ep
Sem Embriões (n=4)	2,1 ± 0,5	4,7 ± 1,9	9,6 ± 2,7	12,5 ± 1,9	13,4 ± 1,8	13,2 ± 1,4	16,3 ± 1,7
Com Embriões (n=5)	2,3 ± 0,4	3,8 ± 1,7	36,7 ± 6,7	29,7 ± 2,0	34,0 ± 5,5	34,5 ± 5,9	37,9 ± 7,8

ANOVA: F=	0,10	0,14	11,64	38,01	10,24	9,81	5,72
P=	0,757	0,725	0,011	0,0005	0,015	0,017	0,048

Figura 3. Efeito luteinizante de embriões em co-cultura com de células da granulosa suplementados com soro de vacas em cio (média \pm ep).



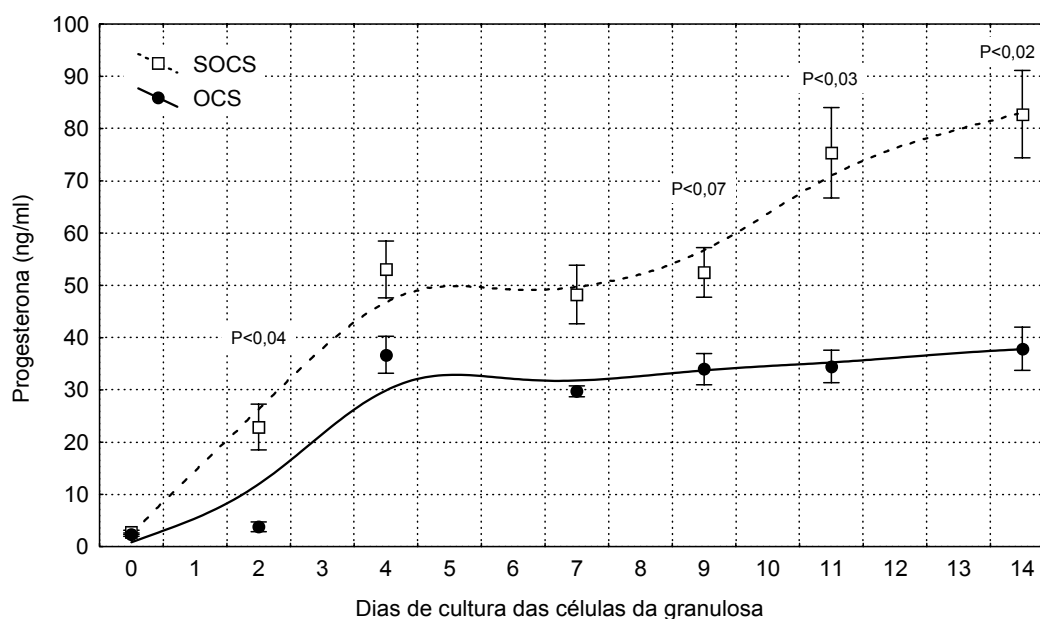
Comparando os dois tipos de suplementação dos meios (SOCS e OCS), verifica-se que o soro proveniente de vacas superovuladas tem um efeito luteinizante significativamente superior ao OCS logo ao 2º dia da cultura, numa altura em que não se fazia sentir ainda o efeito dos embriões. Em D4 e D7 as concentrações de P4 foram sistematicamente superiores no grupo SOCS ($P=0,16$ e $P=0,11$), tornando-se significativas a partir do 9º dia (Tabela 5 e Figura 4).

Tabela 5. Efeito do OCS e SOCS no estímulo à produção de progesterona pelas células da granulosa co-incubadas com embriões.

Concentração de P4 (ng/ml) durante a cultura das células (os embriões são colocados ao 2º dia)							
	D0	D2	D4	D7	D9	D11	D14
	média \pm ep	média \pm ep	média \pm ep	média \pm ep	média \pm ep	média \pm ep	média \pm ep
OCS	2,3 \pm 0,4	3,8 \pm 1,7	36,7 \pm 6,7	29,7 \pm 2,0	34,0 \pm 5,5	34,5 \pm 5,9	37,9 \pm 7,8
SOCS	2,8 \pm 0,39	22,9 \pm 5,7	53,0 \pm 6,1	48,3 \pm 6,4	52,5 \pm 5,1	75,4 \pm 9,5	82,8 \pm 9,2
ANOVA: F=	0,589	5,28	2,14	2,90	3,87	5,79	7,22
P=	0,459	0,039	0,162	0,107	0,065	0,027	0,015

No grupo SOCS existe um aumento mais acentuado de P4 entre D9 e D11 do que no grupo OCS, como se pode constatar na Figura 4. Estes resultados evidenciam que o efeito luteotrófico dos embriões na cultura com OCS estabiliza a partir do 4º dia de cultura. A síntese de P4 na cultura com OCS não apresenta pois a característica bifásica bem evidenciada na cultura com SOCS.

Figura 4. Diferença do OCS e SOCS na produção de P4 pelas células da granulosa co-incubadas com embriões (média±ep)



Discussão

Relativamente ao efeito do soro adicionado ao meio de cultura, verifica-se que o SOCS apresenta um efeito luteotrófico superior ao do OCS, facto evidenciado pelo maior aumento verificado no grupo SOCS ao 2º dia de cultura, período em que os embriões estavam ainda ausentes. O próprio OCS, nas culturas celulares sem embriões, não exerceu um efeito luteotrófico significativo ao longo da cultura. Esta maior capacidade luteotrófica do SOCS relativamente ao OCS, em culturas sem embriões, foi bem evidenciada e discutida num trabalho anterior (Pereira et al., 1997).

Relativamente ao efeito luteotrófico exercido pelos embriões em cultura, ele apresentou características diferentes entre os dois tipos de soros. Assim, no grupo suplementado com SOCS, a progesterona apresenta uma subida bifásica ao longo da cultura. O primeiro incremento de P4 ao 4º dia de cultura, reflecte o efeito de embriões com uma idade de 2-3 dias (fase de 4-16 células), enquanto que o segundo incremento (ao 11º dia da cultura) é devido ao efeito de embriões com 9 dias de idade, correspondente à passagem de blastocito expandido para eclodido. Esta cinética resultou numa elevada correlação entre a idade do embrião e o efeito luteotrófico exercido, apesar do número de embriões ter diminuído ao longo da cultura. Os resultados indicam que a segunda fase de incremento da progesterona, associada aos embriões extrusados, parece ser mediada pelo tipo de suplementação dos meios de cultura, verificando-se estar ausente no caso do soro proveniente de animais não superovulados. Esta diferença pode ser devida ao facto de haver um atraso no crescimento dos embriões em meios com OCS relativamente ao SOCS (Pereira et al., 1997).

Este trabalho demonstra que, mesmo antes da eclosão, os embriões bovinos produzem factores luteotróficos capazes de acelerar o processo de diferenciação das células da granulosa *in vitro*, confirmando os primeiros resultados obtidos por Thibodeaux et al. (1994) em células do

corpo lúteo. O gene responsável pela síntese do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) foi identificado em todos os estadios de desenvolvimento embrionário nos bovinos antes da eclosão da zona pelúcida (Watson et al., 1992). Sabe-se que este factor actua como luteotrófico em culturas de células do corpo lúteo *in vitro* (Battista et al., 1989). Isto é explicado nos estudos de Thibodeaux et al. (1994) ao identificarem aumentos dramáticos na síntese de PGE2 e TNF alfa (tumor necrosis factor), substâncias conhecidas como luteotróficas, em jovens embriões com 48 horas de idade. Por outro lado, o PAF (factor activador das plaquetas), sintetizado por jovens embriões bovinos (Stock e Hansel, 1992), actua como estimulante da síntese de PGDF (Thibodeaux et al., 1993), promovendo assim indirectamente a diferenciação das células da granulosa.

Em blastocitos bovinos a partir dos 7-8 dias de idade, foi identificada a proteína trofoblástica bovina -1 (bTP-1, mais recentemente identificada como interferon- τ) por Hernandez-Ledezma et al. (1992), cuja acção luteotrófica através do aumento da PGE2 e antiluteolítica pela diminuição na síntese de PGF2 α , foi demonstrada anteriormente por Helmer et al. (1989a,b). Os teores de interferon- τ sintetizado pelo blastocito estão positivamente correlacionados com o estadio e qualidade dos embriões (Hernandez-Ledezma et al., 1993). Estes conhecimentos e os resultados por nós obtidos sugerem que o primeiro estímulo luteotrófico envolve a participação do PAF e PDGF e o segundo (promovido por blastocitos expandidos ou eclodidos), parece ser mediado pela acção do interferon- τ já sintetizado por embriões desta idade.

Bibliografia

- 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.
- Helmer, S.D., Gross, T.S., Newton, G.R., Hansen, P.J., Thatcher, W.W. (1989b). 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. (1989a). 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 blastocysts is correlated with their morphological quality and stage of development. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 1-6.
- Hernandez-Ledezma, 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.
- Mann, G.E., Lamming, G.E. (1995). Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *J. Reprod. Fert.*, 104: 1-5.
- Marques, C.C., Pereira, R.M., Vasques, M.I., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. (1997). Efeito das prostaglandinas sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos. 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal, 3-6 de Julho, Estoril.
- Pereira, R.M., Vasques, M.I., Marques, C.C., Baptista, 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.
- 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.
- Thatcher, W.W., Binelli, M., Burke, J., Staples, C.R., Ambrose, J.D., Coelho, S. (1997). Antiluteolytic signals between the conceptus and the 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 Vechio, 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. Relatório de Actividades - Adenda. Relatório apresentado ao Instituto Nacional de Investigação Agrária-Estação Zootécnica Nacional, Vale de Santarém.
- Watson, A.J., Hogan, A., Hahnel, A., Wiemer, K.E., Schultz, G.A. (1992). Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molecular Reproduction and Development*, 31: 87-95.