

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 22/07/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

FLAVIA CAROLINE DESTRO

**Produção de progesterona pelas células luteínicas esteroidogênicas
bovina cultivadas e co-cultivadas *in vitro***

Botucatu – SP

2016

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FLAVIA CAROLINE DESTRO

**Produção de progesterona pelas células luteínicas esteroidogênicas
bovina cultivadas e co-cultivadas *in vitro***

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* Botucatu, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Prof. Dr. Ian Martin

Botucatu – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Destro, Flavia Caroline.

Produção de progesterona pelas células luteínicas esteroidogênicas bovina cultivadas e co-cultivadas *in vitro* / Flavia Caroline Destro. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Coorientador: Ian Martin

Coorientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Capes: 50504002

1. Corpo lúteo. 2. Concanavalina A. 3. Dinoprostá. 4. Células - Cultura e meios de cultura. 5. Progesterona.

Palavras-chave: concanavalina-A; corpo lúteo; cultivo celular; progesterona; prostaglandina F₂alfa.

Nome do autor: Flavia Caroline Destro

Título: Produção de progesterona pelas células luteínicas esteroidogênicas bovina cultivadas e co-cultivadas *in vitro*.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Dr^a. Ines Cristina Giometti

Membro

Departamento Mestrado em Ciência Animal

Campus II- UNOESTE – Presidente Prudente

Prof^o. Dr^o. Anthony César de Souza Castilho

Membro

Faculdade de Ciências Letras

UNESP-Assis

Data da Defesa: 22 de janeiro de 2016.

EPÍGRAFE

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Lourdes Antonia de Moraes Destro, Wilson Destro (in memoriam) e Fabiano Destro.

Minha família!

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta Tese, foi resumir em quase três páginas, toda gratidão e carinho por todas as pessoas que fizeram parte dessa minha trajetória de cinco anos no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP-Botucatu.

Início meus agradecimentos pela minha mãe, que dedica sua vida a seus dois filhos. Obrigada **Dona Lourdes Antonia de Moraes Destro** por, além de me oferecer a oportunidade de estudar, ser meu exemplo de simplicidade, dignidade, bondade e humildade para com os demais.

Agradeço minha **família**. Em especial ao meu único e amado irmão **Fabiano Destro**, minha cunhada **Juliana de Cássia Bonassa**, minhas **tias (os)**, **primas (os)** que sempre torceram por mim!

As minhas “crianças”, **Betinho, Jorginho, Patrícia** (*in memorian*), **Chica** (*in memorian*), **Lili, Zeca** (*in memorian*), **Boehmia e Lessa**, que me darem o amor mais puro durante essa jornada! Em especial ao meu anjo de quatro patas, fiel companheiro, **Mélo!**

As minhas grandes amigas **Angela Cristina da Silva, Elis Grazieli Barbado e Jhoanne Hansen**. As amigas de faculdade **Daniele Terezinha Basseto, Vanessa Covre, Iassudara Garcia, Daniele Ferreira Pereira** e em especial a outras duas que tive o prazer de conviver também durante a pós-graduação **Angelica Lino Rodrigues e Carolina Nogueira de Moraes Maia**. Muito obrigada pela parceria nos momentos bons e ruins, com vocês ao meu lado foi tudo mais fácil!

A todos os meus **colegas e amigos de pós-graduação**. Em especial a **Ana Augusta Pagnano Derussi, Camila Louise Ackermann, Rosiara Maziero, Priscilla Guasti, Renata Uliani, Viviana Vallejo, Midyan Daroz, Yamê Fabres, Paula Bertoni, Leandro Maia, Carlos Renato Guaitolini, Ricardo Monar e Gabriel Monteiro**.

Aos companheiros de equipe, **Henry David Mogollón García, Eduardo Trevisol, Rodrigo Ferrazza, Carla Martins de Queiroz, Milena Copolla, Felipe Dalanezi e Julian Ochoa**.

Aos companheiros de trabalho, durante meu estágio na **Penn State University**, **Camilla Hughes, Samar Al Maalouf, Lindy Steinberger, Sadhat Walusimbi,**

Jordan Fairman, Sreelakshmi Vasudevan, Manasi Manohar Kamat e Molly Fetter. Ao **Dr. Troy Ott.** Obrigada pela paciência e aprendizado!

À **Michele Chernega**, um anjo que Deus colocou em meu caminho durante meu estágio nos EUA. Aos meus queridos roommates, **Atefeh Mohammadpour** (Irã), **Tsiriandrimanana Rakotondraibe** e **Fenitra Sy Tanjona** (Madagascar) e **Jocely Santos** (Brasil). A **Mrs. Gladies** pelas flores e sua doçura! I missed everyone!

Aos meus amigos brasileiros que me acolheram tão bem em State College, **Juliana Lopes, Michel Baldin, Glauco Pilon, Fellipe Carneiro, Patrick Callegari Magnani** e **Fabício Vieira**. E a todos os **colegas internacionais** que conquistei durante os seis meses de convivência!

À minha supervisora no exterior **Prof. Dra. Joy Lee Pate**, muito obrigada pela paciência, oportunidade e ensinamentos. Serei eternamente grata por tudo!

Ao meu orientador durante o Mestrado e agora no Doutorado, **Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira**, que sempre me deu liberdade nas escolhas, mas ao mesmo tempo apoio e orientação quando eu falhei! Muito obrigada pela paciência, pela parceria e por me fazer acreditar mais no meu potencial!

Ao meu Co-orientador e amigo **Prof. Dr. Ian Martin**, pela paciência, ajuda, conselhos e por sempre acreditar em mim! Obrigada Ian!

À minha Co-orientadora **Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga**. Obrigada pelos direcionamentos sempre que precisei!

Aos Profs.(a) Drs. (a) **Ines Cristina Giometti, Anthony César de Souza Castilho, Fabiana Ferreira de Souza** e **Maria Denise Lopes** por participarem da banca como membros titulares. E aos Profs. Drs. **Lindsay Unno Gimenes, Eunice Oba** e **Jair Camargo Ferreira** por participarem como membros suplentes.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP-Botucatu)**. Ao **Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (Lança)**, a **Pós-Graduação** e ao **Curso de Biotecnologia Animal** da FMVZ (Unesp-Botucatu). A todos os **Professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária**.

A todos os **animais experimentais**. Sem eles esse trabalho não seria possível de ser realizado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão de um ano de bolsa de estudos. À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de estudos (2013/00992-3),

pelo auxílio financeiro (2013/07439-8) e pela bolsa de estudos no exterior (2015/01940-2).

E a **Deus**, pelo amparo e proteção,

“Todas as coisas cooperam para o bem, daqueles que te amam”.

E a todos que direta ou indiretamente participaram e torceram para que esse trabalho fosse concluído!

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| Tabela | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Concentração média de progesterona no meio de cultivo com as LCs no D1 e D7 para amostras com 10% SFB e SFB-free..... | 64 |

CAPÍTULO 2

| Tabela | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Média e erro padrão da concentração de progesterona nos D1 e D7 de cultivo de células luteínicas esteroidogênicas para amostras com LH (100 µg/mL) e sem LH..... | 80 |
| 2 | Média e erro padrão da concentração de progesterona nos D1 e D7 de cultivo para amostras tratadas com PGF2 α (10 ng/mL) ou sem PGF2 α | 82 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|-------------------|---|--------|
| 1 | Esquema representativo das etapas da via esteroidogênica em uma célula luteal esteroidogênica..... | 29 |
| 2 | Modelo representativo das vias envolvidas nas funções e regulação da célula luteal grande (LLC)..... | 33 |
| CAPÍTULO 1 | | |
| 1 | Média e erro padrão da média das concentrações de progesterona no meio de cultivo no D1 de células luteínicas esteroidogênicas cultivadas sem SFB (SFB-free; painel esquerdo/barras cinza) ou cultivadas com 10% SFB (painel direito/barras preta)..... | 65 |
| 2 | Média e erro padrão da média das concentrações de progesterona no meio de cultivo no D7 de células luteínicas esteroidogênicas cultivadas sem SFB (SFB-free; painel esquerdo/barras cinza) ou cultivadas com 10% SFB (painel direito/barras preta)..... | 66 |
| 3 | Média e erro padrão da média do número de células luteínicas esteroidogênicas no D7 cultivadas sem SFB (SFB-free; painel esquerdo/barras cinza) ou cultivadas com 10% SFB (painel direito/barras preta)..... | 67 |
| CAPÍTULO 2 | | |
| 1 | Média e erro padrão das concentrações de progesterona no meio de cultivo no D1 de células luteínicas esteroidogênicas cultivadas na presença de diferentes doses de PGF2 α na ausência (painel esquerdo/barras cinza) ou presença de LH (painel direito/barras preta)..... | 80 |
| 2 | Média e erro padrão das concentrações de progesterona no meio de cultivo no D7 de células luteínicas esteroidogênicas cultivadas na presença de diferentes doses de PGF2 α na ausência (painel esquerdo/barras cinza) ou ausência de LH (painel direito/barras preta)..... | 81 |
| 3 | Média e erro padrão da concentração de progesterona no meio de cultivo no D1 de cultivo e/ou co-cultivo de células do CL. Painel esquerdo/barras cinza: Ausência de PGF2 α ; Painel direito/barras preta: Presença de PGF2 α | 82 |
| 4 | Média e erro padrão da concentração de progesterona no meio de cultivo no D7 de cultivo e/ou co-cultivo de células do CL. Painel | |

| | |
|--|-----------|
| esquerdo/barras cinza: Ausência de PGF2 α ; Painel direito/barras preta: Presença de PGF2 α | 83 |
|--|-----------|

LISTA DE ABREVIATURAS

μm - Micrômetros

3 β -HSD - Enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

BSA – Albumina sérica bovina

Ca²⁺ - Íons de cálcio

CL – Corpo lúteo

CO₂ - Gás carbônico

Con-A - Concanavalina A

DAG - Diacilglicerol

ECs – Células luteínicas endoteliais

E2 - Estradiol

FSH - Hormônio folículo estimulante

GH - Hormônio do crescimento

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

ICs – Células imunes

INC - Certificado Nacional de Incorporação

INF- γ – Interferon gama

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

IL1- β – Interleucina 1 β

ITS - Insulina, transferrina e selênio

LCs – Células luteínicas esteroideogênicas

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

LTC4 - Leucotrieno C4

LH - Hormônio luteinizante

LLC – Células luteínicas grandes (*large luteal cells*)

M - Molar

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1

MHC - Molécula de histocompatibilidade maior

mL – Mililitro

ng – Nanograma

NO – Óxido nítrico

P4- Progesterona

P450_{scc} - Enzima citocromo P450 *side chain cleavage*

PBR - Receptor periférico tipo benzodiazepínico

PGs – Prostaglandinas

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGF₂ α – Prostaglandina F₂ α

PGI₂ – Prostaglandina I₂

PIP₃ - Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PKA - Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

RNA_m – RNA mensageiro

RPM – Rotação por minuto

SFB – Soro fetal bovino

SLC – Células luteínicas pequenas (*small luteal cells*)

StAR - Proteína reguladora aguda da esteroidogênese

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------|----|
| RESUMO | 16 |
| ABSTRACT | 18 |
| INTRODUÇÃO | 21 |
| OBJETIVO GERAL | 22 |
| HIPÓTESES | 22 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| REFERÊNCIAS | 39 |
| CAPÍTULO I | 59 |
| CAPÍTULO II | 71 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 91 |
| ANEXOS | 94 |

DESTRO, F. C. **Produção de progesterona pelas células luteínicas esteroidogênicas bovina cultivadas e co-cultivadas *in vitro***. Botucatu, 2016. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista

RESUMO

O objetivo geral do trabalho foi caracterizar a produção de progesterona (P4) pelas células do corpo lúteo (CL) bovino submetidas a diferentes meios de cultivo e co-cultivo *in vitro*. Para tanto foram realizados três experimentos descritos em dois artigos. No artigo I, CLs pertencentes à fase média (10-12 dias, n=5) foram coletados e processados em laboratório. As LCs foram cultivadas por 07 dias em atmosfera úmida a 5% de CO₂, com ou sem a adição de 10% de soro fetal bovino (SFB), com os respectivos tratamentos: CONTROLE; CONA (10 µg/mL); LH (100 µg/mL); CONALH; LHPGF2α (10 ng/mL); CONALHPGF2α. Amostras de meio de cultivo foram coletadas nos D1 e D7 para posterior dosagem de P4. Valores com P<0,05 foram considerados diferentes estatisticamente. O cultivo de LCs na presença de CONA diminuiu a capacidade secretória de P4 das LCs e este efeito foi revertido pela adição de LH no meio de cultivo no D1, mas não no D7. A ação supressora da CONA foi mais evidente no cultivo que não empregaram o SFB. No artigo II, No Exp. 1, foram utilizados CLs pertencentes à fase média (10-12 dias, n=4). No laboratório os CLs foram processados e as LCs foram cultivadas por 07 dias em atmosfera úmida a 5% de CO₂. As LCs receberam os respectivos tratamentos com ou sem LH: Controle; PGF2α (10 ng/mL); PGF2α (100 ng/mL); PGF2α (354,5 ng/mL). As amostras que receberam LH apresentaram maior produção de P4, e a administração de diferentes doses de PGF2α não mostrou alteração na secreção de P4. No Exp. 2, foram utilizados CLs pertencentes à fase média (10-12 dias, n=4). No laboratório os CLs foram processados e as LCs, células luteínicas endoteliais (ECs) e células imunes (ICs) foram isoladas e co-cultivadas por 07 dias em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Os grupos foram divididos com ou sem PGF2α em: Controle: LC no fundo da placa; Controle: EC no fundo da placa; Co-cultivo: LC+EC+IC no fundo da placa; LC (fundo da placa) + EC+IC (interior do inserto); EC (fundo da placa) + LC+IC (interior do inserto). Não foi observado variação na produção de P4, quando adicionado PGF2α no cultivo e co-cultivo das células do CL. Em ambos os experimentos, amostras de meio de cultivo foram coletadas nos D1 e D7 para posterior dosagem de P4. Valores com P<0,05 foram considerados diferentes estatisticamente. Conclui-se que o cultivo e co-cultivo *in vitro*

das células do CL bovino são ferramentas alternativas para o estudo da função luteínica, contudo há a necessidade de maiores ajustes metodológicos a fim de se mimetizar processos fisiológicos relacionados a esteroidogênese e a luteólise.

Palavras-chave: corpo lúteo, cultivo celular, concanavalina-A, prostaglandina F₂α, progesterona.

DESTRO, F. C. **Progesterone production by the steroidogenic luteal cells cultured and co-cultured *in vitro* in cattle.** Botucatu, 2014 Thesis (doctoral degree) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo State University.

ABSTRACT

The general objective of this study was to characterize the production of progesterone (P4) by the cells of the bovine corpus luteum (CL) subjected to different culture and co-culture media *in vitro*. To this end, three experiments described in two articles were conducted. Article I: CLs belonging to the middle phase (10-12 days, n=5) were collected and processed in the laboratory. The luteal cells (LCs) were cultured for 07 days in a humid atmosphere of 5% CO₂, with or without the addition of 10% fetal bovine serum (FBS), with their respective treatments: CONTROL; CONA (concanavalin-A) (10 µg/mL); LH (100 µg/mL); CONALH; LHPGF2α (10 ng/mL); CONALHPGF2α. Samples of culture medium were collected on D1 and D7 for further P4 measurement. P values <0.05 were considered statistically different. Culture of LCs in the presence of CONA decreases the ability of LC to secrete P4, and this effect was reversed by addition of LH in the culture medium in D1, but not in D7. The suppressive action was more evident in CONA cultures without FBS. In Article II, Experiment 1, CLs of middle phase of the estrous cycle (10-12 days, n = 4) were used. In the laboratory, the CLs were processed and the LCs were cultured for 07 days in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The LCs received the respective treatments with or without LH (100 µg/mL): Control; PGF2α (10 ng/mL); PGF2α (100 ng/mL); PGF2α (354,5 ng/mL). The samples that received LH produced more P4, and the administration of different doses of PGF2α showed no change in P4 secretion. In Experiment 2, CLs of middle phase of the estrous cycle (10-12 days, n = 4) were used. In the laboratory, the CLs were processed and the LCs, luteal endothelial cells (ECs) and immune cells (ICs) were isolated and co-cultured for 07 days in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The groups were divided with or without PGF2α: Control: LC on bottom of the plate; Control: EC on bottom of the plate; Co-culture: LC + EC + IC on bottom of the plate; LC (bottom of the plate) + EC + IC (inside the insert); EC (bottom of the plate) + LC + IC (inside the insert). It was not observed variation in the production of P4, when added PGF2α in culture and co-culture of cells from CL. In both experiments, samples of culture medium were collected on D1 and D7 for further P4 measurement. P values <0.05 were considered statistically different. We conclude that the *in vitro* culture and co-culture of bovine CL cells are alternative tools for the study of luteal function, but

there is a need for further methodological adjustments in order to mimic physiological processes related to steroidogenesis and luteolysis.

Keywords: corpus luteum, cell culture, concanavalin-A, prostaglandin F₂ α , progesterone.

Introdução

INTRODUÇÃO

A espécie bovina (*Bos taurus*) foi domesticada e selecionada, constituindo importante fonte de proteína animal para a população humana. Com o crescimento populacional há a necessidade de maximizar a eficiência dos processos produtivos para que as demandas por alimento da sociedade moderna sejam supridas.

A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e conseqüentemente da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, é o maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e sexto maior produtor de leite (MAPA, 2014). A cadeia produtiva da carne movimenta R\$ 167,5 bilhões por ano, gerando aproximadamente sete milhões de empregos (NEVES, 2012). Em 2013 o país produziu 9,6 milhões toneladas de carne bovina, dos quais cerca de 7,6 milhões toneladas foram destinadas ao mercado interno (MAPA, 2014).

O ciclo estral bovino tem uma duração média de 21 dias, classificado em duas fases, uma marcada pela alta concentração de estradiol (E2; Fase folicular) e outra de progesterona (P4; Fase luteínica). Durante a fase luteínica ocorre a formação, desenvolvimento e regressão do corpo lúteo (CL), glândula transitória responsável pela produção de P4 (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O hormônio luteinizante (LH) produzido pela adeno-hipófise é importante para o desenvolvimento e função do CL, na maioria dos mamíferos, embora a hormônio do crescimento, prolactina, e o E2 também tenham seu papel em diversas espécies. O CL é composto por uma população celular bem heterogênea, que interage e secretam fatores parácrino/autócrinos e hormônios (NISWENDER et al., 2000b). Dentre as principais células estão as células luteínicas esteroidogênicas (LCs), compostas pelas células luteínicas pequenas (*Small luteal cells*, SLC), parecem ser originária das células da teca e respondem ao LH com o aumento da secreção de P4. O segundo tipo celular presente no CL são as células luteínicas grandes (*Large luteal cells*, LLC), parecem ter origem das células da granulosa e contêm receptores de PGF2 α , capazes de mediar as ações luteolíticas. E por fim o CL contém numerosas células não-esteroidogênicas, como fibroblastos, células luteínicas endoteliais (ECs) e células imunes (ICs; MARTIN; FERREIRA, 2009; PATE; KEYES, 2001; WILTBANK et al., 2012).

Por volta de 17 dias após a ovulação e na ausência da fertilização ocorrerá a luteólise, fenômeno caracterizado pela liberação pulsátil de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) de origem uterina (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). A ação da PGF_{2α} de origem uterina parece ser amplificada também pela sua produção intraluteínica pelas LCs (TSAI; WILTBANK, 1997). Esses fenômenos provocam a interrupção da produção de P4 e a apoptose dos diversos tipos celulares presentes nessa glândula (DUFFY; STOUFFER, 2001).

Devido à importância do CL para a regulação do ciclo estral e manutenção da gestação, os estudos da sua função e componentes celulares são fundamentais para a melhor compreensão dos processos envolvidos no ciclo reprodutivo. Entretanto, o estudo *in vivo* da função luteínica necessita de grandes investimentos logísticos e econômicos. Nesse contexto, o cultivo de células e fragmentos de CL têm se mostrado uma possibilidade alternativa para o estudo da função glandular. Contudo, o cultivo *in vitro* das células do CL ainda apresenta uma série de desafios a serem estudados e elucidados, de modo a permitir a criação de modelos de estudo da luteogênese, bem como da luteólise. Esse trabalho tem como objetivo caracterizar a produção de P4 pelas células do CL bovino submetidas a diferentes meios de cultivo e co-cultivo *in vitro*.

Objetivo geral:

Caracterizar a produção de P4 pelas células do CL bovino submetidas a diferentes meios de cultivo e co-cultivo *in vitro*.

Hipóteses:

- O tempo de cultivo interfere na concentração de P4;
- A adição de 10% soro fetal bovino (SFB) e LH no meio de cultivo incrementa a produção de P4 pelas LCs cultivadas *in vitro*;
- A concanavalina-A (CONA) tem efeito direto na produção de P4 pelas LCs cultivadas *in vitro*;
- A PGF_{2α} interfere na produção de P4 pelas LCs cultivadas e co-cultivadas *in vitro*.

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, acreditamos que a CONA possui ação direta nas LCs, comprometendo a produção de P4 a partir da formação de um complexo LDL/CONA que inviabiliza a internalização da glicoproteína, substrato importante para a produção de P4 pelas LCs. Contudo, essa ação é revertida, quando o LH é adicionado ao meio de cultivo.

A utilização de PGF2 α no cultivo e co-cultivo *in vitro* das células do CL não apresentou variação no padrão de produção de P4. Acreditamos que as células do CL quando cultivadas *in vitro* tenham seu comportamento alterado, comprometendo a real sinalização autócrina e parácrina dessas células.

Mais estudos são necessários para compreender as interações entre a CONA e as LCs na espécie bovina, bem como o esclarecimento das ações da PGF2 α *in vitro*, com a utilização de ferramentas alternativas como a expressão de genes relacionados aos receptores de LH, HDL e LDL, PGF2 α e a ação das enzimas envolvidas na esteroidogênese da célula luteínica, a fim de se esclarecer as dúvidas não esclarecidas no nosso trabalho.