

**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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 F<sub>2</sub>alfa.

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ines Cristina Giometti

Membro

Departamento Mestrado em Ciência Animal

Campus II- UNOESTE – Presidente Prudente

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. 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 Fabrício 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

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

### CAPÍTULO 2

| <b>Tabela</b> |                                                                                                                                                                  | <b>Página</b> |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1</b>      | 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..... | <b>80</b>     |
| <b>2</b>      | Média e erro padrão da concentração de progesterona nos D1 e D7 de cultivo para amostras tratadas com PGF2 $\alpha$ (10 ng/mL) ou sem PGF2 $\alpha$ .....        | <b>82</b>     |

## 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ ; Painel direito/barras preta: Presença de PGF2 $\alpha$ .....                                  | 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 $\alpha$ ; Pannel direito/barras<br>preta: Presença de PGF2 $\alpha$ ..... | <b>83</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$  - Micrômetros

3 $\beta$ -HSD - Enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

BSA – Albumina sérica bovina

Ca<sup>2+</sup> - Íons de cálcio

CL – Corpo lúteo

CO<sub>2</sub> – 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- $\gamma$  – Interferon gama

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

IL1- $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$

ITS - Insulina, transferrina e selênio

LCs – Células luteínicas esteroidogênicas

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

P450scc - Enzima citocromo P450 *side chain cleavage*

PBR - Receptor periférico tipo benzodiazepínico

PGs – Prostaglandinas

PGE2 – Prostaglandina E2

PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina F2 $\alpha$

PGI2 – Prostaglandina I2

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

PKA - Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

RPM – Rotação por minuto

SFB – Soro fetal bovino

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

StAR - Proteína reguladora aguda da esteroidogênese

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## 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 CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub>. 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 CO<sub>2</sub>. 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 F2 $\alpha$ , 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% CO<sub>2</sub>, 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% CO<sub>2</sub>. 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% CO<sub>2</sub>. 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 F<sub>2</sub> $\alpha$ , 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 consequentemente 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 $\alpha$ , 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  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) de origem uterina (ACOSTA; MIYAMOTO, 2004). A ação da  $PGF2\alpha$  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  $PGF2\alpha$  interfere na produção de P4 pelas LCs cultivadas e co-cultivadas *in vitro*.

*Revisão de literatura*

## REVISÃO DE LITERATURA

### Ovulação

Em bovinos, a ovulação ocorre aproximadamente 24 horas após o pico do hormônio luteinizante (LH) e induz uma cascata de eventos que culminam com a ruptura do folículo e liberação do oócito (BRÄNNSTRÖM; ENSKOG, 2002; DIELEMAN et al., 1983). Em resposta a onda de LH, o folículo pré-ovulatório produz mediadores inflamatórios, que podem aumentar a permeabilidade vascular, o fluxo sanguíneo local e a migração das células imunes (ICs) para dentro do folículo pré-ovulatório (BRÄNNSTRÖM; ENSKOG, 2002).

As prostaglandinas (PGs) desempenham papel fundamental no momento da ovulação (KASIMANICKAM et al., 2009; MURDOCH; DAILEY; INSKEEP, 1981). A concentração folicular de PGE2 e PGF2 $\alpha$  aumenta conforme a onda de LH, mas apenas a PGF2 $\alpha$  permanece elevada até a ovulação, enquanto o aumento da PGE2 é transitório (CAVENDER; MURDOCH, 1988; DUFFY; STOUFFER, 2001; MURDOCH et al., 1986; SIROIS; DORÉ, 1997).

As PGs parecem ter propriedades leucotáticas, induzindo a migração das células imunes (ICs; FORD-HUTCHINSON et al., 1977; SHIRASUNA et al., 2012; TILL et al., 1979). Após a onda de LH, os neutrófilos são as primeiras ICs identificadas no folículo pré-ovulatório (BRÄNNSTRÖM; NORMAN, 1993; CAVENDER; MURDOCH, 1988; PATE et al., 2010). Os macrófagos são encontrados nas células da granulosa no estágio avançado de atresia folicular, e acredita-se que usem suas habilidades fagocíticas para remover debris celulares durante a apoptose dessas células (GAYTAN et al., 1998; PATE et al., 2010; PETROVSKÁ; DIMITROV; MICHAEL, 1996; TAKAYA et al., 1997).

### Composição celular do corpo lúteo

O corpo lúteo (CL) é um dos tecidos de crescimento mais rápidos do corpo, comparável a de tumores de crescimento acelerado (BASERGA et al., 1988; MANN, 2009; REYNOLDS et al., 1994). O CL é composto por uma população heterogênea de células, incluindo as células luteínicas esteroideogênicas (LCs) e as células luteínicas não-esteroideogênicas, tais como ICs, células luteínicas endoteliais (ECs) e fibroblastos (MARTIN; FERREIRA, 2009; PATE; KEYES, 2001; WILTBANK et al., 2012).

Estudos *in vitro* identificaram populações de LCs que diferem quanto à morfologia, capacidade esteroidogênica, responsividade a hormônios e ao tamanho, classificadas em células luteínicas pequenas (SLC, *small luteal cells*) e células luteínicas grandes (LLC, *large luteal cells*; FIELDS; FIELDS, 1996; GRAZUL-BILSKA et al., 2001; KOOS; HANSEL, 1981; MARTIN; FERREIRA, 2009; O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989; URSELY; LEYMARIE, 1979). O'SHEA et al. (1989) demonstraram que as SLC compreendem apenas 20% do volume do CL, e 25% do número total de células, ao passo que as LLC representam aproximadamente 40% do volume total do CL, mas apenas 10% do número total de células.

As SLCs possuem diâmetro médio de 17,2  $\mu\text{M}$ , tem origem das células da teca interna, secretam baixas concentrações de P4 e são responsivas ao LH. As LLCs possuem diâmetro médio de 38,4  $\mu\text{M}$ , são originárias das células da granulosa, produzem altas quantidades de progesterona (P4) e não são responsivas a estimulação com LH (ALILA; HANSEL, 1984; MARTIN; FERREIRA, 2009; NISWENDER et al., 2000; O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989).

As SLCs possuem formato estrelado e núcleo excêntrico de formato irregular com o nucleoplasma densamente corado, retículo endoplasmático liso abundante, retículo endoplasmático rugoso, numerosas mitocôndrias com crista tubular, complexo de Golgi e grânulos de lipídeos (HANSEL et al., 1987; KOOS; HANSEL, 1981; MARTIN; FERREIRA, 2009; MILVAE; HINCKLEY; CARLSON, 1996; O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989). As LLCs são as células esteroidogênicas mais proeminentes, são esféricas, possuem núcleo grande circular centralizado com nucléolo distinto e cromatina dispersa, complexo de Golgi, agrupamentos isolados de retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso em abundância, presença de mitocôndrias esféricas densamente agrupadas, indicativo de sua grande contribuição esteroidogênica e presença de grânulos densos de vários tamanhos. Tais grânulos de secreção são indicativos de células endócrinas (FIELDS; FIELDS, 1996; MARTIN; FERREIRA, 2009; MILVAE; HINCKLEY; CARLSON, 1996).

O crescimento de novos vasos é essencial para a formação e funcionamento do CL e, embora, essa glândula seja um tecido transitório, apresenta-se como um dos tecidos mais vascularizados do corpo (DAVIS; RUEDA; SPANEL-BOROWSKI, 2003; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007). As ECs estão alinhadas aos capilares, eritrócitos e vários leucócitos incluindo eosinófilos, linfócitos-T e macrófagos (ADASHI, 1990; MIYAMOTO et al., 2005). Essas células são conhecidas como

secretoras de fatores ou mensageiros químicos que podem estar envolvidas nos processos luteotróficos e luteolíticos (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005; GIRSH; GREBER; MEIDAN, 1995; MILVAE; HINCKLEY; CARLSON, 1996). As ECs correspondem aproximadamente a 14% do volume e 53% do total de células do CL bovino (DAVIS; RUEDA; SPANEL-BOROWSKI, 2003; MILVAE; HINCKLEY; CARLSON, 1996; O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989).

As citocinas são peptídeos de baixa massa molecular responsável pela adesão, ativação, e recrutamento de leucócitos. Os leucócitos influenciam a atresia folicular, a ovulação e a função luteínica (LIPTAK et al., 2005; TOWNSON; LIPTAK, 2003). Adicionalmente, os macrófagos são importantes por sua atividade fagocitária e por participar na resposta imune envolvida na regressão luteínica (PATE; KEYES, 2001; PATE, 1994; PATE et al., 2010; PETROFF; PETROFF; PATE, 2001). Os fibroblastos possuem diâmetro de aproximadamente 15  $\mu$ M, compreendem 10% de todas as células e 6% do volume total do CL bovino (O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989; SKARZYNSKI; FERREIRA-DIAS; OKUDA, 2008; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007). Os fibroblastos são classicamente associados aos componentes estruturais de um tecido e produzem glicosaminoglicanas, colágeno e também citocinas (PATE, 1994).

### **Desenvolvimento do corpo lúteo**

O CL formado a partir das células remanescentes do folículo ovulado (MAALOUF et al., 2014; ROTHCHILD, 2013). Desenvolve e atinge à maturidade estrutural e funcional durante o período luteínico, e na ausência de gestação, ocorre a regressão da glândula (SPEROFF, 1988). A principal função do CL é a secreção de P4, imprescindível para a manutenção da gestação nos mamíferos (GINTHER et al., 2007, 2009; RODGERS; MITCHELL; SIMPSON, 1988). Se a gestação não ocorrer, a concentração circulante de P4 diminui devido à regressão do CL (MCCRACKEN et al., 1972; SKARZYNSKI; FERREIRA-DIAS; OKUDA, 2008). Isto permite a liberação do LH pela adeno-hipófise, crescimento do folículo ovariano, com consequente aumento das concentrações plasmáticas de estradiol (E2) e início de um novo ciclo. Em resposta ao aumento nos níveis de E2 e aumento da amplitude de LH, as células da granulosa e da teca são submetidas a rápidas mudanças morfológicas e bioquímicas, que permitem a transformação em LCs (ALILA; HANSEL, 1984; O'SHEA; WRIGHT; DAVIS, 1987; REKAWIECKI et al., 2008).

CORNER (1919) propôs pela primeira vez o conceito de que células esteroidogênicas são derivadas das células da granulosa e da teca. HANSEL; SEIFART, (1967) mostraram que SLC são derivadas das células da teca. ALILA; HANSEL, (1984) usaram anticorpos expressos especificamente nas células da granulosa e da teca durante o período de diferenciação, o que lhes permitiu provar a hipótese proposta por CORNER (1919). Além disso, o estudo demonstrou que SLC têm a capacidade de proliferar e diferenciar-se em LLC nos estágios mais tardios do ciclo (ALILA; HANSEL, 1984). MEIDAN et al. (1990) também observaram em um estudo *in vitro* a similaridade entre as células da granulosa e da teca quando sofreram luteinização, em termos de morfologia e produção de P4.

### **Produção de progesterona no corpo lúteo**

O desenvolvimento e funcionalidade do CL são dependentes do LH nos animais domésticos (SCHAMS; BERISHA, 2004). Estudos de KALTENBACH et al. (1968) e DENAMUR; KANN, (1973) demonstraram que as concentrações de P4 caem drasticamente durante a fase lútea, em ovelhas após a remoção da hipófise. A concentração plasmática de P4 também foi reduzida, como consequência da supressão dos pulsos de LH, após a administração de antagonista de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em vacas nos dias 2 e 12 do ciclo estral (PETERS et al., 1994). Embora o LH seja um importantíssimo estímulo para a produção de P4, quase 80% da P4 é sintetizado pelas LLC (CHEGINI et al., 1991; HARRISON; KENNY; NISWENDER, 1987; NISWENDER et al., 2013).

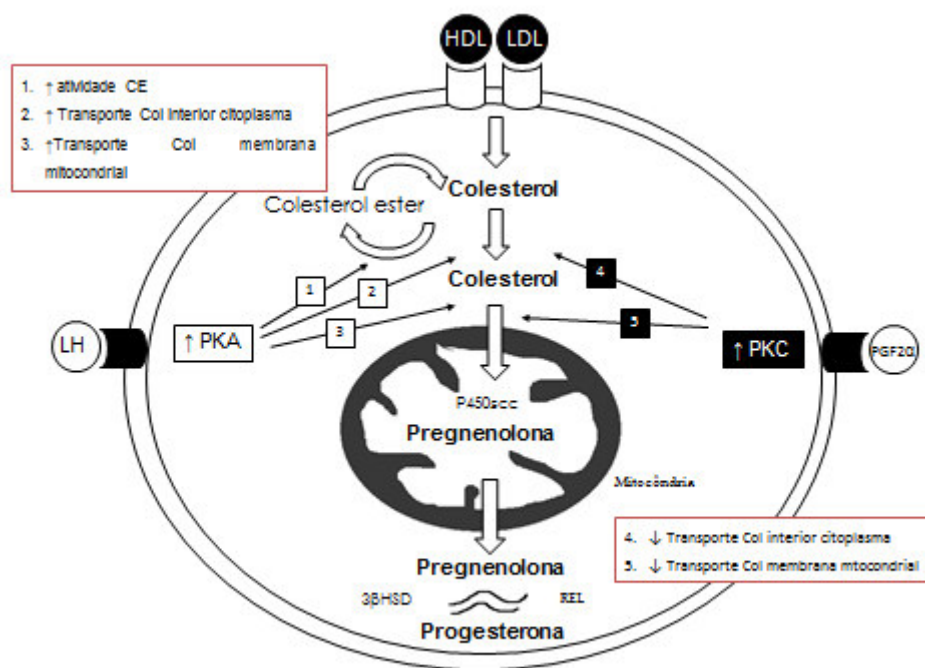
As SLC expressam grande quantidade de receptores para LH em sua membrana e respondem de forma efetiva ao LH *in vitro* (ALILA et al., 1988; NISWENDER et al., 2000; URSELY; LEYMARIE, 1979). O LH estimula a via adenosina monofosfato cíclico/proteína quinase A (AMPc/PKA), aumentando as concentrações de AMPc e a secreção de P4 pelas SLC (HOYER; FITZ; NISWENDER, 1984; NISWENDER et al., 2000; WEST et al., 2001). As LLC não respondem a ligação do LH ao seu receptor na membrana celular e a produção de P4 não é diretamente ativada pela AMPc e PKA (HOYER; NISWENDER, 1986; NISWENDER et al., 2000). DIAZ et al. (2002) concluíram que as SLC são estimuladas para sintetizar P4 através da via AMPc/PKA, enquanto LLC não necessitam da estimulação hormonal do LH devido a grande quantidade AMPc/PKA já existente na célula.

As lipoproteínas de baixa (LDL) ou de alta densidade (HDL) produzidas pelo fígado são as principais fontes de colesterol para a síntese de P4 pelas LCs (GRUMMER; CARROLL, 1988; NISWENDER, 2002; REKAWIECKI et al., 2008). As LCs cultivadas *in vitro* utilizam LDL e HDL para a produção de P4 (PATE; CONDON, 1982). A adição de lipoproteínas nas LCs em cultivo provoca o aumento da produção de P4 (PATE; CONDON, 1982; WILTBANK et al., 1990).

A constatação de que a HDL estimula a produção de P4 mais que a LDL pode não ser tão surpreendente quando se considera que o HDL é a lipoproteína mais abundante no plasma sanguíneo na espécie bovina e é rica em ésteres de colesterol (GRUMMER; CARROLL, 1988). As LCs contêm receptores para LDL/HDL, e esses são responsáveis pela endocitose dessas lipoproteínas (DIAZ et al., 2002). O receptor para LDL liga-se a duas proteínas, a apolipoproteína B e apolipoproteína E (ARGOV; SKLAN, 2004; OSUGA et al., 1998).

Após a internalização das lipoproteínas, o colesterol é clivado no interior do lisossomo (MAXFIELD; WÜSTNER, 2002), e transportado do exterior para o interior da membrana mitocondrial (GRUSENMEYER; PATE, 1992; NISWENDER, 2002; PRIVALLE; CRIVELLO; JEFEOATE, 1983; REKAWIECKI et al., 2008). As principais proteínas envolvidas no transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna são a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR; (BERTAN et al., 2006; MILLER, 2007; STOCCO; CLARK, 1996; STOCCO, 2001) e o receptor periférico tipo benzodiazepínico (PBR; MISHRA; PALAI, 2014; PAPADOPOULOS; BROWN, 1995; WEST et al., 2001). WEST et al. (2001) propuseram que a StAR transfere o colesterol para o PBR, o que facilita a transferência para o interior da membrana mitocondrial.

Uma vez que o colesterol é transportado para a membrana mitocondrial interna pela StAR, o colesterol é convertido em pregnenolona através da enzima citocromo P450 *side chain cleavage* (P450<sub>scc</sub>; HANUKOGLU, 1992; NISHIMURA et al., 2006; NISWENDER, 2002; STOCCO, 2001), a enzima P450<sub>scc</sub> catalisa o primeiro passo da síntese de P4 em uma reação de duas hidroxilações e clivagem da cadeia lateral do colesterol (HANUKOGLU, 1992). A conversão da pregnenolona em P4 pela enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) ocorre no retículo endoplasmático liso (Figura 1; CHRISTENSON; DEVOTO, 2003; LAUBER et al., 1993; NISWENDER, 2002).



**Figura 1.** Esquema representativo das etapas da via esteroidogênica em uma célula luteínica esteroidogênica. A ativação da PKA aumenta a atividade da colesterol esterase (1), o transporte de colesterol no citoplasma (2), e o transporte de colesterol do citoplasma para a membrana mitocondrial interna (3). A ativação da PKC diminui o transporte de colesterol no citoplasma (4) e do citoplasma para a membrana mitocondrial interna (5). Adaptado de Niswender et al. (2000)

O LH estimula a secreção de P4 *in vivo* (NISWENDER et al., 2013) e *in vitro* (DEL VECCHIO et al., 1994; HANSEL; SNOOK, 1970; PATE; CONDON, 1984). Relatos anteriores demonstraram que a suplementação com LH prolongou a vida do CL (HANSEL; SEIFART, 1967; HANSEL; SNOOK, 1970). A liberação pulsátil de LH, também é necessária para o desenvolvimento do CL nos animais domésticos (PATWARDHAN; LANTHIER, 1980; WEBLEY et al., 1991) e primatas (PETERS et al., 1994). Além do LH, outros fatores são responsáveis por regular a esteroidogênese luteínica e aumentar a produção de P4. As catecolaminas estimulam a produção de P4, com o auxílio de receptores  $\beta$ -adrenérgicos encontrados na membrana celular do CL (BATTISTA; CONDON, 1986; BATTISTA et al., 1987; CONDON; BLACK, 1976; PERKINS et al., 1985).

A noradrenalina estimula a secreção de ocitocina pelo ovário e de P4 pelo CL bovino (JAROSZEWSKI; KOTWICA, 1994; KOTWICA; SKARZYNSKI, 1993; KOTWICA et al., 1991). O efeito da noradrenalina sobre a produção de P4 e ocitocina

no CL está associado ao aumento da atividade de enzimas  $3\beta$ -HSD e da P450<sub>scc</sub>, necessárias para a síntese destes dois hormônios (BOGACKI; KOTWICA, 1999; MISZKIEL; KOTWICA, 2001). A noradrenalina aumenta também a disponibilidade de colesterol para a síntese de P4 (WILTBANK et al., 1990).

O neuropeptídeo-Y e polipeptídeo intestinal vasoativo também influenciam a produção de P4 e ocitocina *in vitro* (MIYAMOTO et al., 1993). O hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) também aumentam a produção de P4 (CONSTANTINO; KEYES; KOSTYO, 1991; DEVOTO et al., 1995; LIEBERMANN; SCHAMS, 1994). MILVAE; HANSEL (1980) propuseram que várias PGs poderiam estimular a síntese de P4. A adição das PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> aumentou a produção da P4 pelas LCs cultivadas *in vitro* (MILVAE; HANSEL, 1980).

A PGF<sub>2</sub> $\alpha$  é responsável pela diminuição da síntese de P4 pelas LCs em bovinos, ovinos, suínos, seres humanos, ratos/coelhos pseudogestantes e gestantes *in vivo* (NISWENDER; NETT, 1994; SKARZYNSKI, 2001; TREVISOL et al., 2011). No entanto, há certa dificuldade em demonstrar os efeitos luteolíticos da PGF<sub>2</sub> $\alpha$  sobre a secreção de P4 pelas LCs cultivadas *in vitro*, já que há a necessidade de condições de cultivo apropriadas. Muitos autores observaram a estimulação da secreção de P4 após a adição de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  em cultivo de LCs pertencentes à fase média do ciclo (BAH et al., 2006; KORZEKWA et al., 2008, 2004; OKUDA et al., 1998; SHIRASUNA et al., 2004). A ação luteolítica da PGF<sub>2</sub> $\alpha$  tem participação da proteína quinase C (PKC) e dos íons de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) como segundos mensageiros no interior das LCs (MILVAE; HINCKLEY; CARLSON, 1996; WILTBANK; OTTOBRE, 2003). Portanto, a ação da PGF<sub>2</sub> $\alpha$  deve causar a inibição da secreção de P4 nas LCs (MIYAMOTO et al., 2005; NISWENDER et al., 2000; SEN et al., 2005). Contudo, OKUDA et al. (1998) demonstraram que a PKC pode servir de mediador de possíveis ações luteotróficas da PGF<sub>2</sub> $\alpha$  no cultivo *in vitro* de LCs pertencentes à fase média. A possível razão para tais efeitos estão nos diferentes sistemas de cultivo utilizados e, consequentemente, diferenças no contato célula-a-célula, junções comunicantes e comunicação entre as SLC e LLC e os demais tipos celulares presentes no CL (BAH et al., 2006; KORZEKWA et al., 2004; MIYAMOTO et al., 2005; OKUDA et al., 1998a; SEN et al., 2005; SHIBAYA et al., 2005; SHIRASUNA et al., 2010).

Para diferenciar o sistema de cultivo em monocamada utilizado por OKUDA et al. (1998); SEN et al. (2005) e TSAI; WILTBANK (1997) realizaram seus

experimentos com suspensão de LCs, incubando e estimulando as LCs por um período menor. No sistema de cultivo em suspensão as LCs mantêm o contato célula-célula conservando a morfologia original, assim o citoesqueleto celular mantém sua funcionalidade e uma variedade de componentes celulares, que implicam em uma variedade de processos celulares, tais como a motilidade celular, migração celular, distribuição espacial das organelas celulares e comunicação intracelular (SHIBAYA et al., 2005). KORZEKWA et al. (2008) demonstraram que o sistema de cultivo que garante um agregado tridimensional, permite o contato célula-célula, possibilitando condições mais fisiológicas para a função celular do que o sistema *in vitro* de monocamada (SHIBAYA et al., 2005).

A  $\text{PGF2}\alpha$  pode diminuir a síntese de P4 a partir de diversos mecanismos intracelulares, incluindo a *downregulation* dos receptores de LH, a diminuição da absorção de colesterol pelas células, do transporte de colesterol no interior da célula e/ou das membranas mitocondriais e da atividade das enzimas esteroidogênicas necessárias para a síntese de P4 (FITZ et al., 1993; NISWENDER et al., 2013; PITZEL; JARRY; WUTTKE, 1992; WILTBANK et al., 1990).

### **Regressão do corpo lúteo**

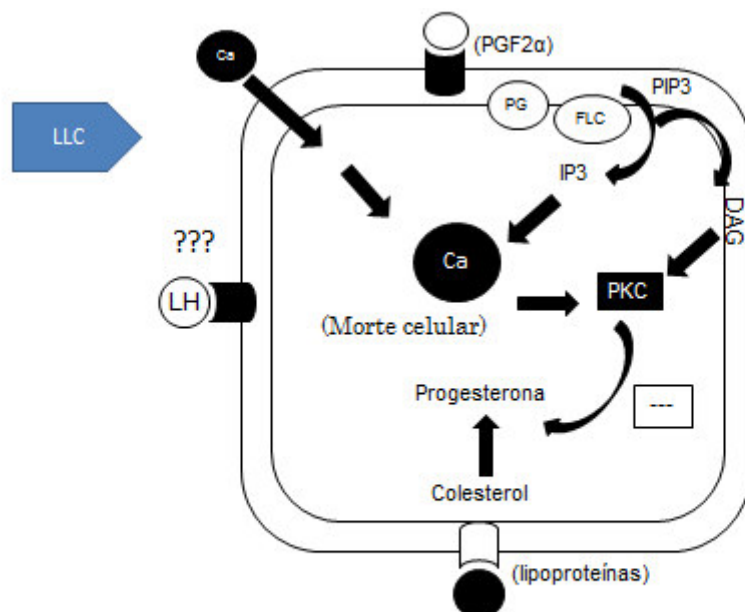
A luteólise é caracterizada pela regressão estrutural e funcional do CL, que ocorre no final da fase lútea na ausência de gestação. O processo de regressão luteínica é dividido em regressão funcional, que ocorre quando as LCs perdem a capacidade de produzir P4 (Revisado por NISWENDER et al., 2000), e regressão estrutural, que envolve a apoptose das células esteroidogênicas e involução do tecido luteínico (Revisado por PATE, 1994).

### **Morte funcional do corpo lúteo**

A  $\text{PGF2}\alpha$  sintetizada pelas células do endométrio, é transportada ao ovário por uma via de transferência de contracorrente da veia uterina para a artéria ovariana, ignorando a circulação sistêmica (GINTHER et al., 1974; LEE et al., 2010; NISWENDER et al., 2013). A  $\text{PGF2}\alpha$  produzida no corno uterino entra na artéria ovariana pela veia utero-ovariana e chega ao CL ipsilateral ao corno que a produziu. Esse percurso destinado ao transporte da  $\text{PGF2}\alpha$ , sem a passagem pela circulação

periférica, impede que  $\text{PGF2}\alpha$  seja imediatamente metabolizada pelos pulmões (PIPER; VANE; WYLLIE, 1970).

A regressão funcional é diretamente estimulada pela ativação da  $\text{PGF2}\alpha$  via receptor de membrana expressos principalmente nas LLC por toda a vida do CL (ALILA et al., 1988; CHEGINI et al., 1991; WILTBANK et al., 1995). Os receptores de  $\text{PGF2}\alpha$  acoplam-se a proteína G e se ligam a receptores de alta afinidade, induzindo a ativação da fosfolipase C (BERRIDGE; IRVINE, 1984; MIWA et al., 1990; SAKAMOTO et al., 2002; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007). A Fosfolipase C catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em inositol 1,4,5- trifosfato ( $\text{IP3}$ ) e 1,2-diacylglicerol (DAG; BERRIDGE; IRVINE, 1984; DAVIS et al., 1988). O aumento nas concentrações citoplasmáticas de  $\text{IP3}$  resulta na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  livre do retículo endoplasmático liso para o citoplasma (BERRIDGE; IRVINE, 1984; REKAWIECKI et al., 2008). O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  livre e DAG, localizados na membrana plasmática, estimula a atividade catalítica do  $\text{Ca}^{2+}$  dependente da PKC (Figura 2; AROSH et al., 2004; NISHIZUKA, 1986). Acredita-se que a PKC está envolvida nas ações anti-esteroidogênicas da  $\text{PGF2}\alpha$  nas LLCs, resultando em modificações das proteínas celulares envolvidas na esteroidogênese, disponibilidade do colesterol, expressão e ativação de proteínas envolvidas na apoptose e manutenção da matriz extracelular (LUM; MALIK, 1996; REKAWIECKI et al., 2008; SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007)



**Figura 2.** Modelo representativo das vias envolvidas nas funções e regulação da célula luteínica grande (LLC). LH, hormônio luteinizante;  $\text{PGF2}\alpha$ , prostaglandina  $\text{F2}\alpha$ ; PG, proteína G causando a estimulação da FLC, fosfolipase; que cliva o  $\text{IP3}$ , trifosfato de inositol; que induz a liberação do cálcio,  $\text{Ca}^{2+}$ . O aumento do DAG, diacilglicerol; da via  $\text{PIP3}$ , fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato com  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a fosforilação de fatores associados com a ativação da  $\text{PKC}$ , proteína quinase C. Adaptado de Niswender et al. (2000).

A  $\text{PKC}$  inibe a produção de  $\text{P4}$  pelas LCs (ALILA et al., 1990; HOUMARD et al., 1991). MCGUIRE; JUENGEL; NISWENDER, (1994) demonstraram farmacologicamente que a ativação da  $\text{PKC}$  *in vivo* causou a diminuição da secreção de  $\text{P4}$ , sem causar a morte das LCs. Além disso, o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular parece suprimir a esteroidogênese induzida pelo LH e pode ser responsável pela indução da morte celular (ALILA et al., 1990; NISWENDER et al., 2006; WILTBANK; KNICKERBOCKER; NISWENDER, 1989).

Os pulsos de ocitocina estimulam uma pequena liberação de  $\text{PGF2}\alpha$  do endométrio que irá desencadear a liberação de ocitocina do CL. As LLC são a fonte de ocitocina luteínica nas ovelhas (RODGERS et al., 1983) e nas vacas (FIELDS et al., 1992). A ocitocina liberada do CL amplifica a liberação de  $\text{PGF2}\alpha$  pelo útero no início da luteólise e diminui à medida que progride a luteólise (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999). A ocitocina é mais abundante no meio do ciclo do CL. Nos dias 17 e

19 do ciclo estral, apenas 5% da LLC contém ocitocina (FIELDS et al., 1992). Vários estudos têm demonstrado que a imunização contra ocitocina prolonga o ciclo estral (COOKE; HOMEIDA, 1984; SCHAMS; PROKOPP; BARTH, 1983).

### **Regressão estrutural do corpo lúteo**

Um dos fatores que contribuem para a regressão do CL é a variação do fluxo sanguíneo luteínico, o tratamento com PGF2 $\alpha$ , inicialmente aumenta o fluxo sanguíneo luteínico, e logo após diminui (ACOSTA et al., 2002; MIYAMOTO et al., 2005; SHIRASUNA et al., 2008). O declínio no fluxo sanguíneo causado pelo enfraquecimento e bloqueio dos vasos com debris celulares, resulta na perda de nutrientes e fatores de crescimento necessários para o suporte luteotrófico (GAYTAN et al., 1999). A perda da vascularidade luteínica prejudica a viabilidade do CL e é um componente necessário para o desencadeamento da luteólise. As ECs são as primeiras afetadas pela PGF2 $\alpha$ , seguida pelas LCs e os fibroblastos (SAWYER et al., 1990).

Durante a luteólise, o CL perde a capacidade esteroidogênica devido a apoptose das células mediada via FAS (JUENGEL et al., 1993; SAWYER et al., 1990; TANIGUCHI; YOKOMIZO; OKUDA, 2002). A regulação da FAS nas LCs é induzida por citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IFNG- $\gamma$  e IL1- $\beta$  (BENYO; PATE, 1992; FAIRCHILD; PATE, 1991; OKUDA; SAKUMOTO, 2003; TOWNSON; PATE, 1996). TANIGUCHI; YOKOMIZO; OKUDA, (2002) demonstraram que o IFN- $\gamma$  e a combinação do TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  aumentam a expressão do RNAm da FAS em cultivo de LCs (JUENGEL et al., 1993; RUEDA et al., 1997).

### **Células imunes e o corpo lúteo**

Diversos estudos tem mostrado a presença das ICs na regressão do CL (PATE; JOHNSON-LARSON; OTTOBRE, 2012; PATE et al., 2010; PENNY et al., 1999; TOWNSON; O'CONNOR; PRU, 2002). As LCs expressam moléculas de histocompatibilidade maior (MHC) classe I e classe II (FAIRCHILD; PATE, 1989; KENNY et al., 1991; PARK et al., 2004; PATE; KEYES, 2001). As moléculas de MHC I são expressas em todas as células nucleadas, enquanto que as moléculas de MHC classe II são expressas apenas nas células apresentadoras de antígenos (BENYO et al., 1991). Foi demonstrado que a expressão de moléculas de MHC I é abundante no início da vida do CL, já as MHC II são mais expressas na fase média, cerca de 80% de moléculas MHC II foram detectados na LLC (BENYO et al., 1991). Além disso, a

expressão de MHC II aumenta também durante a fase tardia do CL e após a ação da  $\text{PGF2}\alpha$  nas SLC. Estes dados fornecem evidências de que as LCs são capazes de processar peptídeos e funcionar de forma semelhante às células apresentadoras de antígenos (BENYO et al., 1991). Após a perda de função, as LCs sofrem involução, com a ação das ICs (PATE; JOHNSON-LARSON; OTTOBRE, 2012; POOLE; PATE, 2012).

Os macrófagos, responsáveis pela fagocitose, aumentam em número durante a regressão luteínica (PAAVOLA, 1979; PATE; KEYES, 2001; SHIRASUNA et al., 2013). A proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) é expressa nas ECs e é responsável por controlar a infiltração de macrófagos no CL durante luteólise (TOWNSON; O'CONNOR; PRU, 2002; TSAI; WILTBANK, 1997).

Os neutrófilos desempenham papel fundamental durante o processo inflamatório, podem contribuir para a citotoxicidade através da produção de óxido nítrico e de radicais superóxido (MCCORMICK; SIBER; MAURELLI, 1998). PETROFF; PETROFF; PATE, 2001, demonstraram que os linfócitos T são ativados após ligação às moléculas de MHC expressas nas LCs. A  $\text{PGF2}\alpha$  afeta as LCs e regula positivamente a sua capacidade de induzir a proliferação das células T (CANNON; PATE, 2006; NDIAYE et al., 2012; POOLE; PATE, 2012).

### **Cultivo e co-cultivo *in vitro* de células do corpo lúteo**

O cultivo celular tem sido utilizado para o estudo das LCs com objetivos e metodologias variadas ao longo dos anos. Os métodos de cultivo variam entre laboratórios e dependem de cada ensaio em específico, do tempo de cultivo, do tipo de célula a ser cultivado isoladamente ou em combinação (co-cultivo), e dos parâmetros a serem avaliados (expressão gênica, expressão proteica, produção hormonal, produção de fatores angiogênicos, viabilidade celular, entre outros; BATISTA, 2011; DEL VECCHIO; THIBODEAUX; HANSEL, 1995; PATE, 1993; ROBINSON et al., 2008).

Os métodos de obtenção do CL para posterior cultivo em laboratório variam entre a remoção cirúrgica de um fragmento (biópsia) por acesso transvaginal guiado por ultrassonografia transretal (CANNON; PATE, 2006; DEL VECCHIO et al., 1994), a obtenção dos ovários por ovariectomia (SHIRASUNA et al., 2010, 2012), enucleação do CL por via transvaginal (CANNON; PATE, 2006; FAIRCHILD; PATE, 1989; TOWNSON; PATE, 1996) ou ainda a aquisição em abatedouros próximos, proveniente

de fêmeas abatidas no local (BATISTA, 2011; KAMADA; IKUMO, 1997; NISHIMURA et al., 2006; SHIBAYA et al., 2005).

O cultivo de células obtida a partir da dissociação enzimática do tecido luteínico parece ser o método mais utilizado pelas diversas equipes de pesquisa, por permitir ensaios de curta (CANNON; PATE, 2006; GRAZUL-BILSKA et al., 1996; KORZEKWA et al., 2008, 2004; THIBODEAUX et al., 1994) e longa duração (ARIKAN; RODWAY, 2000; FRIDÉN et al., 1999; PATE; CONDON, 1982, 1984). Quanto aos métodos de isolamento celular, existe uma grande variedade de métodos disponíveis. Assim, podemos encontrar na literatura ensaios com populações de células heterogêneas produzidas com a simples digestão enzimática do tecido, que podem conter, não só células LCs, mas também ECs e ICs (ARIKAN; RODWAY, 2000; GRAZUL-BILSKA et al., 1996; KORZEKWA et al., 2008; SHIRASUNA et al., 2012; SKARZYNSKI; FERREIRA-DIAS; OKUDA, 2008; TALBOTT et al., 2014).

Ainda são utilizadas populações celulares obtidas a partir de várias técnicas de separação, como a centrifugação em gradientes de Percoll<sup>®</sup> que separa as células pela sua densidade (BATISTA, 2011; FRIDÉN et al., 1999), a citometria de fluxo (DEL VECCHIO et al., 1994), a sedimentação por gravidade (ALILA et al., 1988), a adesão a esferas magnéticas cobertas com anticorpos para antígenos da superfície celular, muito utilizadas para a separação de ECs ou ICs (KOHEN et al., 1999; KORZEKWA et al., 2008; SHIBAYA et al., 2005; SHIRASUNA et al., 2012).

Os sistemas de co-cultivo vem sendo muito empregado para o estudo das interações entre as populações celulares (KORZEKWA et al., 2008, 2004; KUMAGAI et al., 2014; LIPTAK et al., 2005; TALBOTT et al., 2014). Recentemente, esses sistemas são foco de grande interesse para o estudo de sintéticos biológicos e engenharia de complexos sistemas multicelulares (GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2014).

A nível básico, o co-cultivo celular possibilita a interação entre dois ou mais tipos de células com certo grau de contato entre elas. Entre as principais indicações para uso do co-cultivo estão o estudo interações naturais e processos fisiológicos entre as populações celulares, possibilitando a criação de modelos experimentais e ambientes biomimético de sistemas naturais, tais como tecidos artificiais (KOTWICA; SKARZYNSKI, 1993; SCHALLENBERGER et al., 1984; SHIBAYA et al., 2005).

### Concanavalina – A

A concanavalina A (CONA) é uma lectina (proteína ligadora de carboidratos) extraída originalmente do "jack-bean" (ou feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis*), é membro da família das lectinas leguminosas (SHARON; LIS, 2004). A CONA se liga especificamente a certas estruturas encontradas em diversos açúcares, glicoproteínas e glicolipídeos (LIENER, 2012). A CONA é um mitógeno de plantas e é conhecido pela sua habilidade em estimular subgrupos de células T de camundongo (ERHARDT et al., 2007; SASS et al., 2002). A CONA foi a primeira lectina a ser disponibilizada comercialmente, sendo amplamente usada em biologia e bioquímica para caracterizar glicoproteínas e outras entidades dotadas de açúcares na superfície de diversas células (SCHIEFER et al., 1975). Ela também é usada para estudar a regulação de diversas ICs (CHERRY et al., 2008; DWYER; JOHNSON, 1981a; FERNÁNDEZ-RIEJOS et al., 2010; SAKAGUCHI et al., 2001).

O estudo das lectinas começou no século XIX com a descoberta de que extratos de certas plantas além de serem tóxicos para homens e animais poderiam também aglutinar eritrócitos. Devido às lectinas possuírem habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, cada ligação pode resultar em efeitos biológicos variados (MACHUKA et al., 1999; SHARON; LIS, 2004). Alguns destes efeitos servem como base para a aplicação de lectinas na investigação de problemas químicos e biológicos, como por exemplo, a estimulação mitogênica de linfócitos e a inibição do crescimento de células tumorais (LIS; SHARON, 1986; SHARON; LIS, 2004).

Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas às lectinas, destacam-se a identificação de grupos sanguíneos, a caracterização de microorganismos, a estimulação mitogênica de células imunes, a detecção e o isolamento de carboidratos em superfície celular (BEUTH et al., 1995). Estas moléculas estão envolvidas nos processos de reconhecimento e das interações celulares, atividades essenciais na proliferação, diferenciação, inibição por contato e morte celular, assim como na formação de órgãos, migração celular, defesa imunológica, metástases, iniciação de infecções e simbiose (BEUTH et al., 1995; HOLMSKOV et al., 1994; LIS; SHARON, 1986; MODY; MACDONALD, 1995; SHARON; LIS, 1989, 2004). As lectinas mitogênicas possuem a capacidade de aumentar a síntese de DNA e de induzir a transformação blástica de populações específicas de linfócitos (BARBOSA et al., 2001). A estimulação de leucócitos na presença das lectinas pode resultar na produção de diversas citocinas, como as interleucinas (IL-2, IL-3, IL-5, IL-6), fator estimulador de colônia

granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e  $\text{INF-}\gamma$  (COLTRI et al., 2008; GILLESPIE, 2007; LOUIS et al., 2000; NICOLETTI et al., 2000). A função das lectinas endógenas na interação célula-célula e célula-matriz são fundamentais na proliferação, diferenciação e migração celular (SELL, 2008). O processo é mediado pelas interações entre as glicoproteínas de superfície celular, as moléculas de adesão e seus receptores (SELL, 2008).

As lectinas por se ligarem a sacarídeos específico são comumente utilizadas para caracterizar a solubilidade da membrana, caracterizar a ligação de lipoproteínas (LIS; SHARON, 1973; VAUHKONEN et al., 1985) e explorar a topografia da superfície dessas células (WISE; GREEN, 1978). A LDL tem habilidade de inibir a ação hemaglutinante da CONA, isso indica que há uma interação entre as lipoproteínas e as lectinas (HARMONY; CORDES, 1975; VAUHKONEN et al., 1985). A LDL reage diretamente com a CONA formando um complexo (HARMONY; CORDES, 1975). A galactose tem influência na formação desse complexo, sugerindo que a ligação a sacarídeos, ativa o sítio da CONA que participa da reação com a LDL, já que o receptor de LDL contém resíduo de carboidrato (HARMONY; CORDES, 1975).

Há uma gama de trabalhos correlacionando as interações da CONA com as ICs (DWYER; JOHNSON, 1981; GANTNER et al., 1995; INAFUKU et al., 2013; POWELL; LEON, 1970; RITT et al., 2015). No entanto, existem pouquíssimos estudos relacionados à aplicação das lecitinas com as células do CL. LIPTAK et al. (2005) e TALBOTT et al. (2014) observaram a queda da produção de P4 quando adicionado CONA, no entanto em co-cultivo de LCs com ICs. Segundo esses autores o motivo da diminuição da secreção da P4 se deu pelas citocinas pró-inflamatórias derivadas das ICs, como o  $\text{INF-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$ , prejudicando a esteroidogênese das LCs. Provavelmente esse complexo CONA/lipoproteínas inviabiliza a ligação com o receptor para lipoproteínas presente na membrana das LCs, e previne a endocitose dessas moléculas, precursoras na produção de P4. Outra possível ação do complexo CONA/lipoproteínas seria a internalização desse complexo, porém com o comprometimento da ação dos ésteres e enzimas citoplasmáticas, relacionadas a disponibilidade do colesterol para a produção de P4.

## REFERÊNCIAS:

ACOSTA, T. J. et al. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F<sub>2α</sub> injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 651–658, 2002.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 127–140, 2004.

ADASHI, E. L. I. Y. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. **Endocrine Reviews**, v. 11, n. 3, p. 454–464, 1990.

ALILA, H. W. et al. Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. **Journal of reproduction and fertility**, v. 82, n. 2, p. 645–55, mar. 1988.

ALILA, H. W. et al. Differential effects of calcium on progesterone production in small and large bovine luteal cells. **Journal of steroid biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 687–693, 1990.

ALILA, H. W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biology of reproduction**, v. 31, n. 5, p. 1015–1025, 1984.

ARGOV, N.; SKLAN, D. Expression of mRNA of lipoprotein receptor related protein 8, low density lipoprotein receptor, and very low density lipoprotein receptor in bovine ovarian cells during follicular development and corpus luteum formation and regression. **Molecular reproduction and development**, v. 68, n. 2, p. 169–175, 2004.

ARIKAN, Ş.; RODWAY, R. G. Effects of high density lipoprotein containing high or low β-carotene concentrations on progesterone production and β-carotene uptake and depletion by bovine luteal cells. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 4, p. 253–263, 2000.

ARMSTRONG, D. T.; BLACK, D. L. Influence of Luteinizing Hormone on Corpus Luteum Metabolism and Progesterone Biosynthesis Throughout the Bovine Estrous Cycle1. **Endocrinology**, v. 78, n. 5, p. 937–944, 1966.

AROSH, J. A. et al. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2551–2560, 2004.

ATLI, M. O. et al. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F<sub>2α</sub>. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 4, p. 130, abr. 2012.

- BAH, M. M. et al. Role of intraluteal prostaglandin F 2 $\alpha$ , progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 79, n. 3, p. 218–229, 2006.
- BARBOSA, T. et al. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673–678, 2001.
- BASERGA, R. et al. Regulation of the expression of cell cycle genes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 551, n. 1, p. 283–289, 1988.
- BATISTA, M. R. Faculdade de Medicina Veterinária. 2011.
- BATTISTA, P. J. et al. Biogenic amine regulation of bovine luteal progesterone production in vivo. **Journal of reproduction and fertility**, v. 80, n. 2, p. 517–522, 1987.
- BATTISTA, P. J.; CONDON, W. A. A role for alternative pathway catecholamines in the regulation of steroidogenesis in cow luteal cells. **Journal of reproduction and fertility**, v. 78, n. 1, p. 275–280, 1986.
- BECKMAN, J. D. et al. Isolation and characterization of ovine luteal pericytes and effects of nitric oxide on pericyte expression of angiogenic factors. **Endocrine**, v. 29, n. 3, p. 467–476, 2006.
- BENYO, D. F. et al. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine corpus luteum during the estrous cycle, luteolysis, and early pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 2, p. 229–234, 1991.
- BENYO, D. F.; PATE, J. L. Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. **Endocrinology**, v. 130, n. 2, p. 854–860, 1992.
- BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. 1984.
- BERTAN, C. M. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824–840, 2006.
- BEUTH, J. et al. Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases. **Glycoconjugate journal**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 1995.
- BOGACKI, M.; KOTWICA, J. Influence of noradrenaline on progesterone synthesis and posttranslational processing of oxytocin synthesis in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 91–102, 1999.
- BRÄNNSTRÖM, M.; ENSKOG, A. Leukocyte networks and ovulation. **Journal of reproductive immunology**, v. 57, n. 1, p. 47–60, 2002.
- BRÄNNSTRÖM, M. U; NORMAN, R. J. Involvement of leukocytes and cytokines in

the ovulatory process and corpus luteum function. **Human Reproduction**, v. 8, n. 10, p. 1762–1775, 1993.

BYRNE, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; HARMEY, J. H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 4, p. 777, 2005.

CANNON, M. J.; PATE, J. L. Indoleamine 2, 3-dioxygenase participates in the interferon-gamma-induced cell death process in cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 3, p. 552–559, 2006a.

CANNON, M. J.; PATE, J. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase participates in the interferon-gamma-induced cell death process in cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 3, p. 552–9, mar. 2006b.

CAVENDER, J. L.; MURDOCH, W. J. Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 4, p. 989–997, 1988.

CHEGINI, N. et al. Cellular distribution and cycle phase dependency of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lutea. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 3, p. 506–513, 1991.

CHERRY, J. A. et al. Microvascular endothelial cells of the bovine corpus luteum: a comparative examination of the estrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 3, p. 183–191, 2008.

CHRISTENSON, L. K.; DEVOTO, L. Cholesterol transport and steroidogenesis by the corpus luteum. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, n. 1, p. 90, 2003.

COLTRI, K. C. et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **The American journal of pathology**, v. 173, n. 2, p. 423–432, 2008.

CONDON, W. A.; BLACK, D. L. Catecholamine-induced stimulation of progesterone by the bovine corpus luteum in vitro. **Biology of reproduction**, v. 15, n. 5, p. 573–578, 1976.

CONSTANTINO, C. X.; KEYES, P. L.; KOSTYO, J. L. Insulin-Like Growth Factor-I Stimulates Steroidogenesis in Rabbit Luteal Cells\*. **Endocrinology**, v. 128, n. 4, p. 1702–1708, 1991.

COOKE, R. G.; HOMEIDA, A. M. Delayed luteolysis and suppression of the pulsatile release of oxytocin after indomethacin treatment in the goat. **Research in veterinary science**, v. 36, n. 1, p. 48–51, 1984.

CORNER, G. W. On the origin of the corpus luteum of the sow from both granulosa and theca interna. **American journal of Anatomy**, v. 26, n. 1, p. 116–183, 1919.

- DAVIS, J. S. et al. Acute effects of prostaglandin F 2 $\alpha$  on inositol phospholipid hydrolysis in the large and small cells of the bovine corpus luteum. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 58, n. 1, p. 43–50, 1988.
- DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R.; SPANEL-BOROWSKI, K. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, n. 1, p. 89, 2003.
- DEL VECCHIO, R. P. et al. Interactions between large and small luteal cells collected during the mid-or late-luteal stages of the bovine oestrous cycle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 1994.
- DEL VECCHIO, R. P. et al. Interactions between large and small luteal cells collected during the mid- or late-luteal stages of the bovine oestrous cycle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 7, n. 1, p. 35–40, jan. 1995.
- DEL VECCHIO, R. P.; THIBODEAUX, J. K.; HANSEL, W. Contact-associated interactions between large and small bovine luteal cells during the estrous cycle. **Domestic animal endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 25–33, 1995.
- DENAMUR, R.; KANN, G. Luteolytic effects of oestradiol after hypophysectomy or pituitary stalk section in cycling sheep. **Acta endocrinologica**, v. 73, n. 4, p. 635–642, 1973.
- DEVOTO, L. et al. Multihormonal regulation of progesterone synthesis in cultured human midluteal cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 5, p. 1566–1570, 1995.
- DIAZ, F. J. et al. Regulation of progesterone and prostaglandin F 2 $\alpha$  production in the CL. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 65–80, 2002.
- DIELEMAN, S. J. et al. Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. **Journal of reproduction and fertility**, v. 69, n. 2, p. 641–649, 1983.
- DUFFY, D. M.; STOUFFER, R. L. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. **Molecular human reproduction**, v. 7, n. 8, p. 731–739, 2001.
- DWYER, J. M.; JOHNSON, C. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. **Clinical and experimental immunology**, v. 46, n. 2, p. 237–49, 1981a.
- DWYER, J. M.; JOHNSON, C. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. **Clinical and experimental immunology**, v. 46, n. 2, p. 237, 1981b.
- ERHARDT, A. et al. IL- 10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A–induced liver injury in mice. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 475–485, 2007.

ESTERGREEN, V. L. et al. Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 50, n. 8, p. 1293–1295, 1967.

FAIRCHILD, D. L.; PATE, J. L. Interferon-gamma induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 40, n. 3, p. 453–457, 1989.

FAIRCHILD, D. L.; PATE, J. L. Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-gamma. **Biology of reproduction**, v. 44, n. 2, p. 357–363, 1991.

FERNÁNDEZ-RIEJOS, P. et al. Role of leptin in the activation of immune cells. **Mediators of inflammation**, v. 2010, 2010.

FIELDS, M. J. et al. Characterization of large luteal cells and their secretory granules during the estrous cycle of the cow. **Biology of reproduction**, v. 46, n. 4, p. 535–545, 1992.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p. 1295–1325, 1996.

FITZ, T. A. et al. Interactions of prostaglandins with subpopulations of ovine luteal cells. II. Inhibitory effects of PGF 2 $\alpha$  and protection by PGE 2. **Prostaglandins**, v. 28, n. 1, p. 127–138, 1984.

FITZ, T. A. et al. Effects of individual and combined treatment with prostaglandins E2 and F2  $\alpha$  on progesterone secretion by ovine luteal cells supplemented with homologous serum lipoproteins in vitro. **Biology of reproduction**, v. 48, n. 3, p. 662–668, 1993.

FLETCHER, P. W.; NISWENDER, G. D. Effect of PGF 2  $\alpha$  on progesterone secretion and adenylate cyclase activity in ovine luteal tissue. **Prostaglandins**, v. 23, n. 6, p. 803–818, 1982.

FORD-HUTCHINSON, A. W. et al. Prostaglandins and leucocyte migration in inflammatory reactions. **Agents and actions**, v. 7, n. 4, p. 469–472, 1977.

FRIDÉN, B. E. et al. Cell characteristics and function of two enriched fraction of human luteal cells prolonged culture. **Molecular human reproduction**, v. 5, n. 8, p. 714–719, 1999.

GANTNER, F. et al. Concanavalin A—induced T- cell—mediated hepatic injury in mice: The role of tumor necrosis factor. **Hepatology**, v. 21, n. 1, p. 190–198, 1995.

GAYTAN, F. et al. Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event? **Biology of reproduction**, v. 58, n. 1, p. 52–59, 1998.

GAYTAN, F. et al. A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 4, p.

914–919, 1999.

GILLESPIE, M. T. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, n. 2, p. 103, 2007.

GINTHER, O. J. et al. Anatomy of arteries and veins of uterus and ovaries in rhesus monkeys. **Biology of reproduction**, v. 11, n. 2, p. 205–219, 1974.

GINTHER, O. J. et al. Temporal associations among pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub>α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 3, p. 506–513, 2007.

GINTHER, O. J. et al. Necessity of sequential pulses of prostaglandin F<sub>2</sub>α for complete physiologic luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 4, p. 641–648, 2009.

GIRSH, E. et al. Effect of endothelin-1 on bovine luteal cell function: role in prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced antisteroidogenic action. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1306–1312, 1996.

GIRSH, E.; GREBER, Y.; MEIDAN, R. Luteotrophic and luteolytic interactions between bovine small and large luteal-like cells and endothelial cells. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 4, p. 954–62, abr. 1995.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 96, p. 20140065, 2014.

GOYENECHE, A. A; HARMON, J. M.; TELLERIA, C. M. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 131, n. 1, p. 103–11, jan. 2006.

GRAZUL-BILSKA, A. T. et al. Gap junctional protein connexin 43 in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 6, p. 1279–1287, 1996.

GRAZUL-BILSKA, A. T. et al. Effects of second messengers on gap junctional intercellular communication of ovine luteal cells throughout the estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 777–783, 2001.

GRUMMER, R. R.; CARROLL, D. J. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 12, p. 3160–3173, 1988.

GRUSENMEYER, D. P.; PATE, J. L. Localization of prostaglandin F<sub>2</sub>α inhibition of lipoprotein use by bovine luteal cells. **Journal of reproduction and fertility**, v. 94, n. 2, p. 311–318, 1992.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Ciclos reprodutivos. **HAFEZ, ESE; HAFEZ, B.**

**Reprodução Animal**. 7<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, p. 55–67, 2004.

HANSEL, W. et al. Control of steroidogenesis in small and large bovine luteal cells. **Australian journal of biological sciences**, v. 40, n. 3, p. 331–47, jan. 1987.

HANSEL, W.; SEIFART, K. H. Maintenance of luteal function in the cow. **Journal of dairy science**, v. 50, n. 12, p. 1948–1958, 1967.

HANSEL, W.; SNOOK, R. B. Pituitary ovarian relationships in the cow. **Journal of dairy science**, v. 53, n. 7, p. 945–961, 1970.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 8, p. 779–804, 1992.

HARMONY, J. A.; CORDES, E. H. Interaction of human plasma low density lipoprotein with concanavalin A and with ricin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 22, p. 8614–8617, 1975.

HARRISON, L. M.; KENNY, N.; NISWENDER, G. D. Progesterone production, LH receptors, and oxytocin secretion by ovine luteal cell types on days 6, 10 and 15 of the oestrous cycle and day 25 of pregnancy. **Journal of reproduction and fertility**, v. 79, n. 2, p. 539–548, 1987.

HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A. Angiotensin II interacts with prostaglandin F<sub>2α</sub> and endothelin-1 as a local luteolytic factor in the bovine corpus luteum in vitro. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1104–1109, 1999.

HOLMSKOV, U. et al. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. **Immunology today**, v. 15, n. 2, p. 67–74, 1994.

HOUMARD, B. S. et al. The effects of elevation and depletion of intracellular free calcium on progesterone and prostaglandin production by the primate corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 4, p. 560–565, 1991.

HOYER, P. B.; FITZ, T. A.; NISWENDER, G. D. Hormone-Independent Activation of Adenylate Cyclase in Large Steroidogenic Ovine Luteal Cells Does Not Result in Increased Progesterone Secretion\*. **Endocrinology**, v. 114, n. 2, p. 604–608, 1984.

HOYER, P. B.; NISWENDER, G. D. Adenosine 3', 5'-Monophosphate-Binding Capacity in Small and Large Ovine Luteal Cells\*. **Endocrinology**, v. 119, n. 4, p. 1822–1829, 1986.

HU, C.-L. et al. Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by Fas antigen (CD95) and Fas ligand. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 2, p. 518–526, 2001.

HU, C.-L. et al. Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells.

**Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 2, p. 326–338, 2004.

INAFUKU, M. et al. Dietary phosphatidylinositol protects C57BL/6 mice from concanavalin A- induced liver injury by modulating immune cell functions. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 9, p. 1671–1679, 2013.

JAROSZEWSKI, J.; KOTWICA, J. Reduction of ovarian oxytocin content from early luteal phase does not affect the corpus luteum secretory function in cattle.

**Reproduction Nutrition Development**, v. 34, n. 2, p. 175–182, 1994.

JONES, L. S.; OTTOBRE, J. S.; PATE, J. L. Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 85, n. 1–2, p. 33–39, 1992.

JUENGEL, J. L. et al. Apoptosis during luteal regression in cattle. **Endocrinology**, v. 132, n. 1, p. 249–254, 1993.

KALTENBACH, C. C. et al. Effect of pituitary hormones on progesterone synthesis by ovine luteal tissue in vitro. **Endocrinology**, v. 81, n. 6, p. 1407–1409, 1967.

KALTENBACH, C. C. et al. Effect of hypophysectomy on the formation and maintenance of corpora lutea in the ewe. **Endocrinology**, v. 82, n. 4, p. 753–759, 1968.

KAMADA, H.; IKUMO, H. Effect of selenium on cultured bovine luteal cells. **Animal reproduction science**, v. 46, n. 3-4, p. 203–11, abr. 1997.

KARSCH, F. J. et al. Prolonged maintenance of the corpus luteum of the ewe by continuous infusion of luteinizing hormone. **Biology of reproduction**, v. 4, n. 2, p. 129–136, 1971.

KASIMANICKAM, R. et al. Two doses of prostaglandin improve pregnancy rates to timed-AI in a 5-day progesterone-based synchronization protocol in beef cows.

**Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 762–767, 2009.

KENNY, N. et al. Flow cytometric analysis of class I and II MHC antigens on ovine luteal cell types. In: **Signaling mechanisms and gene expression in the ovary**. [s.l.] Springer, 1991. p. 467–472.

KIM, I. et al. A CIDR-based timed AI protocol can be effectively used for dairy cows with follicular cysts. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 206–213, 2006.

KINDAHL, H. et al. The release of prostaglandin F 2 $\alpha$  as reflected by 15-keto-13, 14-dihydroprostaglandin F 2 $\alpha$  in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. **Prostaglandins**, v. 11, n. 5, p. 871–878, 1976.

KOHEN, P. et al. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) Is a Modulator of Human Luteal Cell Steroidogenesis: Localization of the IL Type I System in the Corpus Luteum 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 11, p. 4239–4245, 1999.

KOOS, R. D.; HANSEL, W. The large and small cells of the bovine corpus luteum:

- ultrastructural and functional differences. **Dynamics of ovarian function**, 1981.
- KORZEKWA, A. J. et al. Luteolytic effect of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on bovine corpus luteum depends on cell composition and contact. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 464–472, 2008.
- KORZEKWA, A. et al. Effects of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and nitric oxide on the secretory function of bovine luteal cells. **J Reprod Dev**, v. 50, n. 4, p. 411–417, 2004.
- KOTWICA, J. et al. Effect of norepinephrine on the release of progesterone and ovarian oxytocin in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 26, n. 3, p. 179–191, 1991.
- KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D. Influence of oxytocin removal from the corpus luteum on secretory function and duration of the oestrous cycle in cattle. **Journal of reproduction and fertility**, v. 97, n. 2, p. 411–417, 1993.
- KUMAGAI, A. et al. Auto-amplification system for prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in bovine corpus luteum. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 7, p. 646–654, 2014.
- LAUBER, M. E. et al. cAMP-dependent and tissue-specific expression of genes encoding steroidogenic enzymes in bovine luteal and granulosa cells in primary culture. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 93, n. 2, p. 227–233, 1993.
- LEE, J. et al. Transport of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  pulses from the uterus to the ovary at the time of luteolysis in ruminants is regulated by prostaglandin transporter-mediated mechanisms. **Endocrinology**, v. 151, n. 7, p. 3326–3335, 2010.
- LIEBERMANN, J.; SCHAMS, D. Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum in vitro. **Journal of endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 243–250, 1994.
- LIENER, I. **The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine**. [s.l.] Elsevier, 2012.
- LIPTAK, A. R. et al. Cooperative expression of monocyte chemoattractant protein 1 within the bovine corpus luteum: evidence of immune cell-endothelial cell interactions in a coculture system. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 5, p. 1169–1176, 2005.
- LIS, H.; SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual review of biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 541–574, 1973.
- LIS, H.; SHARON, N. Applications of lectins. **The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, p. 293–370, 1986.
- LOUIS, H. et al. Repeated concanavalin A challenge in mice induces an interleukin 10–producing phenotype and liver fibrosis. **Hepatology**, v. 31, n. 2, p. 381–390, 2000.
- LUM, H.; MALIK, A. B. Mechanisms of increased endothelial permeability. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 74, n. 7, p. 787–800, 1996.
- MAALOUF, S. W. et al. Regulating life or death: Potential role of microRNA in rescue

of the corpus luteum. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 398, n. 1-2, p. 78–88, 2014a.

MAALOUF, S. W. et al. Regulating life or death: Potential role of microRNA in rescue of the corpus luteum. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 398, n. 1, p. 78–88, 2014b.

MAAS, S. et al. Paracrine actions of oxytocin, prostaglandin F2 alpha, and estradiol within the human corpus luteum. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 306–312, 1992.

MACHUKA, J. S. et al. Isolation and partial characterisation of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 721–728, 1999.

MANN, G. E. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal reproduction science**, v. 115, n. 1, p. 296–299, 2009.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 270–279, 2009.

MAXFIELD, F. R.; WÜSTNER, D. Intracellular cholesterol transport. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, n. 110 (7), p. 891–898, 2002.

MCCORMICK, B. A.; SIBER, A. M.; MAURELLI, A. T. Requirement of the *Shigella flexneri* virulence plasmid in the ability to induce trafficking of neutrophils across polarized monolayers of the intestinal epithelium. **Infection and immunity**, v. 66, n. 9, p. 4237–4243, 1998.

MCCRACKEN, J. A. et al. Prostaglandin F2 $\alpha$  identified as a luteolytic hormone in sheep. **Nature**, v. 238, n. 83, p. 129–134, 1972.

MCCRACKEN, J. A. et al. identification of prostaglandin F2alpha as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control its synthesis. **Acta veterinaria scandinavica**, 1981.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological reviews**, v. 79, n. 2, p. 263–323, 1999.

MCGUIRE, W. J.; JUENGEL, J. L.; NISWENDER, G. D. Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F2 alpha in the ovine corpus luteum in vivo. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 4, p. 800–806, 1994.

MEIDAN, R. et al. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. **Biology of reproduction**, v. 43, n. 6, p. 913–921, 1990.

MICHAEL, A. E.; ABAYASEKARA, D. R. E.; WEBLEY, G. E. The luteotrophic

- actions of prostaglandins E2 and F2 $\alpha$  on dispersed marmoset luteal cells are differentially mediated via cyclic AMP and protein kinase C. **Journal of endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 291–298, 1993.
- MILLER, W. L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 6, p. 663–676, 2007.
- MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p. 1327–1349, 1996.
- MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2 $\alpha$  in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 2000.
- MILVAE, R. A.; HANSEL, W. The effects of prostacyclin (PGI 2) and 6-keto-PGF 1 $\alpha$  on bovine plasma progesterone and LH concentrations. **Prostaglandins**, v. 20, n. 4, p. 641–647, 1980.
- MISHRA, S. R.; PALAI, T. K. Steroidogenesis in luteal cell: A critical pathway for progesterone production. **apoptosis**, v. 11, p. 16, 2014.
- MISZKIEL, G.; KOTWICA, J. Mechanism of action of noradrenaline on secretion of progesterone and oxytocin by the bovine corpus luteum in vitro. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 49, n. 1, p. 39–51, 2001.
- MIWA, M. et al. Involvement of pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein in prostaglandin F 2 $\alpha$ -induced phosphoinositide hydrolysis in osteoblast-like cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 171, n. 3, p. 1229–1235, 1990.
- MIYAMOTO, A. et al. Multiple effects of neuropeptide Y, substance P and vasoactive intestinal polypeptide on progesterone and oxytocin release from bovine corpus luteum in vitro. **Journal of endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 451–458, 1993.
- MIYAMOTO, A. et al. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic animal endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 329–339, 2005.
- MODY, I.; MACDONALD, J. F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca 2+ release. **Trends in pharmacological sciences**, v. 16, n. 10, p. 356–359, 1995.
- MURDOCH, W. J. et al. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biology of reproduction**, v. 35, n. 5, p. 1187–1194, 1986.
- MURDOCH, W. J.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K. Preovulatory Changes in Prostaglandins E and F  $\alpha$  in Ovine Follicles. **Journal of animal science**, v. 53, n. 1, p. 192–205, 1981.

- MUSAH, A. I.; SCHWABE, C.; ANDERSON, L. L. Relaxin, oxytocin, and prostaglandin effects on progesterone secretion from bovine luteal cells during different stages of gestation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 195, n. 2, p. 255–260, 1990.
- NDIAYE, K. et al. Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors. **Journal of reproductive immunology**, v. 95, n. 1, p. 15–26, 2012.
- NETT, T. M.; MCCLELLAN, M. C.; NISWENDER, G. D. Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. **Biology of reproduction**, v. 15, n. 1, p. 66–78, 1976.
- NEVES, M. F. Estratégias para a carne bovina no Brasil. **São Paulo: Atlas**, v. 1, p. 237, 2012.
- NICOLETTI, F. et al. Murine Concanavalin A–Induced Hepatitis Is Prevented by Interleukin 12 (IL-12) Antibody and Exacerbated by Exogenous IL-12 Through an Interferon- $\gamma$ –Dependent Mechanism. **Hepatology**, v. 32, n. 4, p. 728–733, 2000.
- NISHIMURA, R. et al. Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 147, n. 9, p. 4273–4280, 2006.
- NISHIZUKA, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. **Science**, v. 233, n. 4761, p. 305–312, 1986.
- NISWENDER, G. D. et al. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biology of reproduction**, v. 14, n. 1, p. 64–81, 1976.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000a.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, jan. 2000b.
- NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333–339, 2002.
- NISWENDER, G. D. et al. Judge, jury and executioner: the auto-regulation of luteal function. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, p. 191–206, 2006.
- NISWENDER, G. D. et al. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. **Recent Prog Horm Res** 1985, v. 41, p. 101–151, 2013.
- NISWENDER, G. D.; NETT, T. M. Corpus luteum and its control in infraprimate species. **The physiology of reproduction**, v. 1, p. 781–816, 1994.
- O'GRADY, J. P. et al. Inhibition of progesterone synthesis in vitro by prostaglandin F2 $\alpha$ . **Journal of reproduction and fertility**, v. 30, n. 1, p. 153–156, 1972.

- O'SHEA, J. D.; NIGHTINGALE, M. G.; CHAMLEY, W. A. Changes in small blood vessels during cyclical luteal regression in sheep. **Biology of reproduction**, v. 17, n. 2, p. 162–177, 1977.
- O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of reproduction and fertility**, v. 85, n. 2, p. 483–487, 1989.
- O'SHEA, J. D.; WRIGHT, P. J.; DAVIS, K. E. Morphometric estimation of the numbers of granulosa cells in preovulatory follicles of the ewe. **Australian journal of biological sciences**, v. 40, n. 4, p. 451–458, 1987.
- OKUDA, K. et al. Progesterone Stimulation by Prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$  Involves the Protein Kinase C Pathway in Cultured Bovine Luteal Cells. v. 44, n. 1, 1998a.
- OKUDA, K. et al. Progesterone Stimulation by Prostaglandin F<sub>2</sub>. ALPHA. Involves the Protein Kinase C Pathway in Cultured Bovine Luteal Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 44, n. 1, p. 79–84, 1998b.
- OKUDA, K. Progesterone Is a Suppressor of Apoptosis in Bovine Luteal Cells. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 2065–2071, 2004.
- OKUDA, K.; SAKUMOTO, R. Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 1, p. 95, 10 nov. 2003.
- OSUGA, J. et al. Cholesterol lowering in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing apolipoprotein E. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 2, p. 386, 1998.
- PAAVOLA, L. G. The corpus luteum of the guinea pig. IV. Fine structure of macrophages during pregnancy and postpartum luteolysis, and the phagocytosis of luteal cells. **American Journal of Anatomy**, v. 154, n. 3, p. 337–363, 1979.
- PAPADOPOULOS, V.; BROWN, A. S. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 53, n. 1, p. 103–110, 1995.
- PARK, Y. H. et al. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. v. 5, p. 29–39, 2004.
- PATE, J. L. Isolation and culture of fully differentiated bovine luteal cells. **Methods Toxicol**, v. 3, p. 358–370, 1993.
- PATE, J. L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal of animal science**, v. 72, n. 7, p. 1884–1890, 1994.
- PATE, J. L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**,

v. 45, n. 7, p. 1381–1397, 1996.

PATE, J. L. et al. The interface of the immune and reproductive systems in the ovary: lessons learned from the corpus luteum of domestic animal models. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 4, p. 275–286, 2010.

PATE, J. L.; CONDON, A. Effects of serum and lipoproteins on. v. 28, p. 551–562, 1982a.

PATE, J. L.; CONDON, W. A. Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 28, n. 3, p. 551–562, 1982b.

PATE, J. L.; CONDON, W. A. Effects of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on agonist-induced progesterone production in cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 31, n. 3, p. 427–435, 1984.

PATE, J. L.; CONDON, W. A. Regulation of steroidogenesis and cholesterol synthesis by prostaglandin F-2 $\alpha$  and lipoproteins in bovine luteal cells. **Journal of reproduction and fertility**, v. 87, n. 2, p. 439–446, 1989.

PATE, J. L.; JOHNSON-LARSON, C. J.; OTTOBRE, J. S. Life or death decisions in the corpus luteum. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 4, p. 297–303, ago. 2012.

PATE, J. L.; JOHNSON- LARSON, C. J.; OTTOBRE, J. S. Life or death decisions in the corpus luteum. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. s4, p. 297–303, 2012.

PATE, J. L.; KEYES, P. L. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 665–676, 2001.

PATE, J. L.; NEPHEW, K. P. Effects of in vivo and in vitro administration of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on lipoprotein utilization in cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 38, n. 3, p. 568–576, 1988.

PATWARDHAN, V. V; LANTHIER, A. Concentration of prostaglandins PGE and PGF, estrone, estradiol, and progesterone in human corpora lutea. **Prostaglandins**, v. 20, n. 6, p. 963–969, 1980.

PENNY, L. A. et al. Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis. **Journal of reproduction and fertility**, v. 115, n. 1, p. 87–96, 1999.

PERKINS, S. N. et al.  $\beta$ -Adrenergic Binding and Secretory Responses of the Anterior Pituitary\*. **Endocrinology**, v. 117, n. 5, p. 1818–1825, 1985.

PETERS, K. E. et al. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1248–1254, 1994.

PETROFF, M. G.; PETROFF, B. K.; PATE, J. L. Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 121, n. 5, p. 753–60, maio 2001.

PETROVSKÁ, M.; DIMITROV, D. G.; MICHAEL, S. D. Quantitative changes in macrophage distribution in normal mouse ovary over the course of the estrous cycle examined with an image analysis system. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 36, n. 3, p. 175–183, 1996.

PIPER, P. J.; VANE, J. R.; WYLLIE, J. H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature**, v. 225, p. 600–604, 1970.

PITZEL, L.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Different steroidogenic response of young and aged porcine small and large luteal cells to prostaglandin F2 alpha, oxytocin and estradiol. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 101, n. 4, p. 255–261, 1992.

POOLE, D. H.; PATE, J. L. Luteal microenvironment directs resident T lymphocyte function in cows. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 2, p. 29, 2012.

POWELL, A. E.; LEON, M. A. Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. **Experimental cell research**, v. 62, n. 2, p. 315–325, 1970.

PRAKASH, B. S. et al. Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. **Journal of steroid biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 623–627, 1987.

PRIVALLE, C. T.; CRIVELLO, J. F.-; JEFEOATE, C. R. Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 3, p. 702–706, 1983.

REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Contact-Dependent Intercellular Communication of Bovine Luteal Cells in Culture\*. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 2757–2766, 1991.

REKAWIECKI, R. et al. Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, n. suppl 9, p. 75–89, 2008.

REYNOLDS, L. P. et al. Mitogenic factors of corpora lutea. **Progress in growth factor research**, v. 5, n. 2, p. 159–175, 1994.

RITT, M. G. et al. Stimulation with Concanavalin-A Induces IL-17 Production by Canine Peripheral T Cells. **Veterinary Sciences**, v. 2, n. 2, p. 43–51, 2015.

ROBINSON, R. S. et al. A novel physiological culture system that mimics luteal angiogenesis. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 135, n. 3, p. 405–13, mar. 2008.

RODGERS, R. J. et al. Large luteal cells the source of luteal oxytocin in the sheep.

**Endocrinology**, v. 113, n. 6, p. 2302–2304, 1983.

RODGERS, R. J.; MITCHELL, M. D.; SIMPSON, E. R. Secretion of progesterone and prostaglandins by cells of bovine corpora lutea from three stages of the luteal phase. **Journal of endocrinology**, v. 118, n. 1, p. 121–126, 1988.

ROTHCHILD, I. **The regulation of the mammalian corpus luteum** Recent Progress in Hormone Research: Proceedings of the 1980 Laurentian Hormone Conference. **Anais...** Academic Press, 2013

RUEDA, B. R. et al. Increased bax and interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 1, p. 186–193, 1997.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunological reviews**, v. 182, n. 1, p. 18–32, 2001.

SAKAMOTO, K. et al. Cloning and Characterization of the Novel Isoforms for PGF 2 $\alpha$  Receptor in the Bovine Corpus Luteum. **Mitochondrial DNA**, v. 13, n. 5, p. 307–311, 2002.

SASS, G. et al. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. **Cytokine**, v. 19, n. 3, p. 115–120, 2002.

SAWYER, H. R. et al. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF 2 $\alpha$ . **Domestic animal endocrinology**, v. 7, n. 2, p. 229–237, 1990.

SCHALLENBERGER, E. et al. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. **Journal of reproduction and fertility**, v. 71, n. 2, p. 493–501, 1984.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. **Reproduction in domestic animals**, v. 39, n. 4, p. 241–251, 2004.

SCHAMS, D.; PROKOPP, S.; BARTH, D. The effect of active and passive immunization against oxytocin on ovarian cyclicity in ewes. **Acta endocrinologica**, v. 103, n. 3, p. 337–344, 1983.

SCHIEFER, H.-G. et al. Ultrastructural visualization of surface carbohydrate structures on mycoplasma membranes by concanavalin A. **Journal of bacteriology**, v. 124, n. 3, p. 1598, 1975.

SCHWARTZMAN, R. A.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis: The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death\*. **Endocrine reviews**, v. 14, n. 2, p. 133–151, 1993.

SELL, A. M. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 22, p. 297–303, 2008.

SEN, A. et al. Effects of selective protein kinase c isozymes in prostaglandin $2\alpha$ -induced  $Ca^{2+}$  signaling and luteinizing hormone-induced progesterone accumulation in the mid-phase bovine corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 4, p. 976–984, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227–234, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R–62R, 2004.

SHIBAYA, M. et al. Involvement of the cytoskeleton in oxytocin secretion by cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 1, p. 200–5, jan. 2005.

SHIRASUNA, K. et al. Real-time dynamics of prostaglandin  $F2\alpha$  release from uterus and corpus luteum during spontaneous luteolysis in the cow. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 189–195, 2004.

SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin  $F2\alpha$  increases endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. **Reproduction**, v. 135, n. 4, p. 527–539, 2008.

SHIRASUNA, K. et al. Distribution of Arteriolo-venous Vessels, Capillaries and eNOS Expression in the Bovine Corpus Luteum During the Estrous Cycle: a Possible Implication of Different Sensitivity by Luteal Phase to  $PGF2$ . ALPHA. in the Increase of Luteal Blood Flow. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 1, p. 124–130, 2010.

SHIRASUNA, K. et al. Expression of prostaglandin  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) receptor and its isoforms in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and  $PGF2\alpha$ -induced luteolysis. **Domestic animal endocrinology**, v. 43, n. 3, p. 227–238, 2012.

SHIRASUNA, K. et al. Emerging roles of immune cells in luteal angiogenesis. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 2, p. 351–61, jan. 2013.

SHORT, R. V. The synthesis and secretion of steroids by the corpus luteum. **Archives d'anatomie microscopique et de morphologie experimentale**, v. 56, n. 3, p. 258–272, 1966.

SIROIS, J.; DORÉ, M. The Late Induction of Prostaglandin G/H Synthase-2 in Equine Preovulatory Follicles Supports Its Role as a Determinant of the Ovulatory Process 1. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4427–4434, 1997.

SKARZYNSKI, D. J. Auto/paracrine regulation of the  $PGF2\alpha$  action in the bovine corpus luteum. **Dzialalnosc Naukowa (wybrane zagadnienia)**, n. 12, p. 129–132, 2001.

SKARZYNSKI, D. J. et al. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin  $F2$ -induced luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1674–1681, 2003.

- SKARZYNSKI, D. J. et al. Fas-mediated apoptosis is suppressed by calf serum in cultured bovine luteal cells. **Reproductive biology**, v. 7, n. 1, p. 3–15, mar. 2007.
- SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA- DIAS, G.; OKUDA, K. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. s2, p. 57–65, 2008.
- SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Sensitivity of Bovine Corpora Lutea to Prostaglandin F<sub>2</sub> Is Dependent on. v. 1298, p. 1292–1298, 1999.
- SPEROFF, L. The effects of oral contraceptives on reproduction. **International journal of fertility**, v. 34, p. 34–39, 1988.
- STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine reviews**, v. 28, n. 1, p. 117–149, 2007.
- STOCCO, D. M. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. **Annual Review of Physiology**, v. 63, n. 1, p. 193–213, 2001.
- STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells\*. **Endocrine reviews**, v. 17, n. 3, p. 221–244, 1996.
- STRAUSS, JF. et al. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. **Adv Lipid Res**, v. 18, p. 99–157, 1981.
- TAKAYA, R. et al. Macrophages in normal cycling human ovaries; immunohistochemical localization and characterization. **Human Reproduction**, v. 12, n. 7, p. 1508–1512, 1997.
- TALBOTT, H. et al. Effects of IL8 and immune cells on the regulation of luteal progesterone secretion. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 148, n. 1, p. 21–31, 2014.
- TANIGUCHI, H.; YOKOMIZO, Y.; OKUDA, K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 754–759, 2002.
- THIBODEAUX, J. K. et al. Stimulation of progesterone production in bovine luteal cells by co-incubation with bovine blastocyst-stage embryos or trophoblastic vesicles. **Journal of reproduction and fertility**, v. 101, n. 3, p. 657–662, 1994.
- TILL, G. et al. Chemokinetic and chemotactic activity of various prostaglandins for neutrophil granulocytes. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 12, n. 1, p. 111–118, 1979.
- TOWNSON, D. H.; LIPTAK, A. R. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, p. 94, 2003.
- TOWNSON, D. H.; O'CONNOR, C. L.; PRU, J. K. Expression of monocyte

chemoattractant protein-1 and distribution of immune cell populations in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 2, p. 361–366, 2002.

TOWNSON, D. H.; PATE, J. L. Mechanism of action of TNF- $\alpha$ -stimulated prostaglandin production in cultured bovine luteal cells. **Prostaglandins**, v. 52, n. 5, p. 361–373, 1996.

TREVISOL, E. et al. Rescue of Luteal Function in Cattle after Challenge with Cloprostenol Sodico. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1 Supplement, p. 224, 2011.

TREVISOL, E. et al. Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandin (cloprostenol sodium) in cattle. **Animal reproduction science**, v. 153, p. 8–12, 2015.

TSAL, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1016–22, nov. 1997.

URSELY, J.; LEYMARIE, P. Varying response to luteinizing hormone of two luteal cell types isolated from bovine corpus luteum. **Journal of Endocrinology**, v. 83, n. 3, p. 303–NP, 1979.

VAUHKONEN, M. et al. High- mannose structure of apolipoprotein- B from low-density lipoproteins of human plasma. **European Journal of Biochemistry**, v. 152, n. 1, p. 43–50, 1985.

VILLAVICENCIO, A. et al. Regulation of steroid synthesis and apoptosis by insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 in human corpus luteum during the midluteal phase. **Reproduction**, v. 124, n. 4, p. 501–508, 2002.

WEBLEY, G. E. et al. Preincubation of human granulosa cells with gonadotrophin prevents the cloprostenol-induced inhibition of progesterone production. **Human Reproduction**, v. 6, n. 6, p. 779–782, 1991.

WEST, L. A. et al. Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. **Endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 502–505, 2001.

WIESAK, T.; HARDIN, R. T.; FOXCROFT, G. R. Evaluation of in vitro culture conditions to demonstrate pregnancy-dependent changes in luteal function in the pig. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 2, p. 254–261, 1994.

WILTBANK, M. C. et al. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$ . **Biology of reproduction**, v. 42, n. 2, p. 239–245, 1990.

WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal of animal science**, v. 72, n. 7, p. 1873–1883, 1994.

- WILTBANK, M. C. et al. Prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$  receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 1, p. 74–8, jan. 1995.
- WILTBANK, M. C. et al. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminant s. p. 242–259, 2012.
- WILTBANK, M. C.; KNICKERBOCKER, J. J.; NISWENDER, G. D. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C Phosphorylation activity and steroidogenic action in large and small ovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1194–1200, 1989.
- WILTBANK, M. C.; OTTOBRE, J. S. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, p. 91, 2003.
- WISE, L. S.; GREEN, H. Studies of lipoprotein lipase during the adipose conversion of 3T3 cells. **Cell**, v. 13, n. 2, p. 233–242, 1978.
- WOLFENSON, D. et al. Effects of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$  production in bovine luteal cells. **Animal Reproduction Science**, v. 32, n. 1, p. 27–40, 1993.
- WRIGHT, K.; PANG, C. Y.; BEHRMAN, H. R. Luteal Membrane Binding of Prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$  and Sensitivity of Corpora Lutea to Prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$ -Induced Luteolysis in Pseudopregnant Rats\*. **Endocrinology**, v. 106, n. 5, p. 1333–1337, 1980.

## CAPÍTULO I

### **EFEITOS DA CONCANAVALINA-A NA PRODUÇÃO DE PROGESTERONA NO CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS LUTEÍNICAS ESTEROIDOGÊNICAS EM BOVINOS**

Este artigo será submetido em formato de *short communication* ao periódico **Reproduction in Domestic Animal** e encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas. Contudo, está sendo utilizada a língua portuguesa e as figuras estão entre os parágrafos dos resultados apenas para facilitar a leitura e discussão da tese.

## Short Communication

### Efeitos da concanavalina-A na produção de progesterona no cultivo *in vitro* de células luteínicas esteroidogênicas em bovinos

FC Destro<sup>1</sup>, I Martín<sup>2</sup>, FC Landim e Alvarenga<sup>1</sup>, JL Pate<sup>3</sup>, JCP Ferreira

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil; <sup>2</sup>Universidade de Uberaba (Uniube), Uberaba, Minas Gerais, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Ciência Animal, Universidade Estadual da Pensilvânia (Penn State University), University Park, Pensilvânia, Estados Unidos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da concanavalina-A (CONA) na produção de progesterona (P4) no cultivo *in vitro* de células luteínicas esteroidogênicas (LCs) bovinas. Corpos lúteos (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 CO<sub>2</sub>, 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. As células foram contadas no D7 de cultivo. 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. O número de células não variou entre os tratamentos empregados.

O CL é um órgão transitório responsável pela secreção de P4, essencial para o estabelecimento e manutenção da gestação na espécie bovina. Caso a gestação não seja estabelecida, o CL regride com rápida perda da secreção de P4, seguido pelo rompimento dos vasos sanguíneos e da morte das LCs (Maalouf et al., 2014; McCracken et al., 1981; Nett et al., 1976).

Devido sua importância, a esteroidogênese luteínica bovina é foco de extensos estudos *in vivo* e *in vitro*. A maioria dos estudos *in vitro* envolve incubações de curta

duração de pequenos fragmentos de tecidos ou LCs dissociadas. Embora de uso limitado nos estudos de longa duração, os sistemas de cultivo *in vitro* das LCs excluem a influência hormonal endógena, presente nos estudos *in vivo* (Pate e Condon, 1982), e se constituem em poderosa ferramenta para investigações de curto prazo da função luteínica (Pate, 1993).

A CONA, lectina derivada do “Jack bean” (feijão-de-porco - *Canavalia ensiformis*) capaz de interagir com diversas moléculas contendo manose, é frequentemente empregada em estudos relacionados à função das células imunes dos mamíferos, sendo capaz de induzir a proliferação de células T supressoras. Outra característica da CONA é a sua capacidade de se ligar com a lipoproteína de baixa densidade (LDL) formando um complexo (Harmony e Cordes, 1975).

Liptak et al. (2005) e Talbott et al. (2014) observaram a queda da produção luteínica de P4 quando a CONA foi adicionada a um sistema de co-cultivo *in vitro* de LCs e células imunes (ICs) e atribuíram esse efeito a provável ação antiesteroideogênica das citocinas pró-inflamatórias derivadas das ICs (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8). Contudo, devido a sua capacidade de se ligar ao LDL, a ação anti-esteroideogênica da CONA pode também estar relacionada ao impedimento da ligação das lipoproteínas com o seu receptor nas LCs, prevenindo a endocitose dessas moléculas, precursoras do colesterol, substrato para a produção de P4. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da CONA na produção de P4 no cultivo *in vitro* exclusivo de LCs bovinas.

Todos os procedimentos com o uso de animais foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de ética da Universidade Estadual da Pensilvânia (Penn State University). Foram utilizadas vacas da raça holandesa, preto e branco, não lactantes, com idade entre 04 e 08 anos, com ciclo estral regular. Os CLs pertencentes à fase média (10-12 dias após a ovulação) foram coletados por enucleação transvaginal. Uma vez removido, o CL foi imediatamente colocado em meio de cultivo Ham's F-12 (Gibco, Invitrogen Corporation) contendo 20  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina (Gentamicin Reagent Solution; Invitrogen Corporation), acondicionado em caixa de transpote com gelo e transportado até o laboratório para posterior processamento. A dissociação do tecido luteínico foi realizada de acordo com o método descrito por Pate, (1993).

Após a remoção do tecido conectivo, o CL foi dividido em quatro partes, cortado e adicionado em meio de cultivo Ham's F-12 suplementado com 0.5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, A9056), 20  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina e 2000 U/g tissue

colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, LS004196). O conteúdo foi transferido para um becker com agitador magnético e incubado por 60 minutos em banho-maria a 37°C, com agitação em baixa velocidade. Durante a incubação, as células foram vigorosamente aspiradas com uma pipeta a cada 10 minutos para facilitar a dissociação tecidual. O sobrenadante contendo LCs foi centrifugado (208xg por 10 minutos). O *pellet* foi ressuspensionado em 10 mL de meio Ham's F-12 contendo gentamicina e mantidos em caixa com gelo. Os fragmentos de tecido não digeridos foram incubados em solução de colagenase por mais 60 minutos. Após a 2ª hora de dissociação as células foram lavadas por três vezes em centrifugações repetidas para remoção do BSA e da colagenase. Seguindo a dissociação, as LCs foram ressuspensionadas em meio de cultivo Ham's F-12, o número de células foi determinado usando hemocitômetro.

As placas de cultivo foram pré-incubadas com meio de cultivo suplementadas com 10% de SFB (Gibco®, Life Technologies, 12483-020) por no mínimo 30 minutos, e depois lavadas com meio Ham's F-12 contendo 20 µg/mL de gentamicina. A concentração celular foi  $2 \times 10^5$  células/mL, distribuídas em placa de cultivo de 24 poços (1mL/poço) por sete dias. A viabilidade celular foi determinada pela coloração Azul de Trypan. Foram realizados um total de cinco replicatas (n=5 CLs), durante todo o experimento. As LCs foram incubadas em meio de cultivo Ham's F-12 com SFB ou sem SFB (SFB-free), suplementadas com ITS Premix™ (5 µg/mL insulina, 5 µg/mL transferrina, 5 ng/mL selênio; Corning, Ref.354351) e 20 µg/mL de gentamicina a 38°C em atmosfera úmida (5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar) e submetido aos seguintes tratamentos: controle: meio de cultivo SFB-free; CONA: meio de cultivo SFB-free + CONA (10 µg/mL); LH: meio de cultivo SFB-free + Hormônio luteinizante (LH-100 µg/mL); CONALH: meio de cultivo SFB-free + CONA (10 µg/mL) + LH (100 µg/mL); LHPGF2α: meio de cultivo SFB-free + LH (100 µg/mL) + PGF2α (10 ng/mL); CONALHPGF2α: meio de cultivo SFB-free + CONA (10 µg/mL) + LH (100 µg/mL) + PGF2α (10 ng/mL); controle/SFB: meio de cultivo 10% SFB; CONA/SFB: Meio de cultivo 10% SFB + CONA (10 µg/mL); LH/SFB: meio de cultivo 10% SFB + LH (100 µg/mL); CONALH/SFB: meio de cultivo 10% SFB + CONA (10 µg/mL) + LH (100 µg/mL); LHPGF2α/SFB: meio de cultivo 10% SFB + LH (100 µg/mL) + PGF2α (10 ng/mL); CONALHPGF2α/SFB: meio de cultivo 10% SFB + CONA (10 µg/mL) + LH (100 µg/mL) + PGF2α (10 ng/mL);

Após 24 horas, o meio de cultivo foi coletado e estocado a -20°C para determinar a concentração de P4. Em seguida, foi adicionado 100% de meio de cultivo fresco de acordo com os respectivos tratamentos. O mesmo procedimento foi repetido a cada 48 horas até completar sete dias de cultivo. A concentração de P4 foi mensurada no meio nos D1 e D7 de cultivo utilizando a técnica de enzimaímunoensaio direto (EIA) como descrito previamente por Prakash et al. (1987). A HRP-P4 foi usada em uma concentração final de 1:75.000. A curva padrão variou entre 0,39 e 100 ng/mL e a dose efetiva para 50% de inibição do ensaio (ED 50) foi de 4.5 ng/mL. A absorbância foi mensurada pelo leitor (VICTOR3, Perkin Elmer. Co) e as concentrações de P4 apresentadas em ng/mL. O coeficiente de variação (CV) intra e inter-ensaio foram 5,5% e 8,5%, respectivamente. Foram contados dois campos por poço e os resultados foram expressos como média das células contadas/campo.

A análise estatística dos efeitos do experimento, tratamentos e concentração de P4 no meio de cultivo, foram analisadas utilizando Two-way ANOVA seguido por teste de múltiplas comparações (Teste de Tukey ANOVA; Graphpad Prism). Os resultados foram expressos em média±SEM. Foram consideradas com significância estatística quando  $P < 0,05$ .

A concentração média de P4 no meio de cultivo no D1 (558,0 ng/mL) foi maior que no D7 (25,4 ng/mL;  $P < 0,05$ ). Considerando que a P4 dosada no D1 é referente à produção de 24 horas e que a do D7 corresponde à produção de 48 horas, os resultados sinalizam uma perda importante da capacidade esteroidogênica luteínica ao longo do cultivo, fenômeno bem documentado em outros estudos *in vitro* de LCs obtidas de CL de 10-12 dias (Del Vecchio et al., 1995; Pate e Condon, 1982).

A semelhança do observado em outros estudos, a concentração de P4 no meio de cultivo dos tratamentos que receberam 10% SFB foi maior que a observada nos tratamentos SFB-free (Tabela 1; Pate e Condon, 1982, 1989; Pate e Nephew, 1988; Pate, 1993). Devido a grande diversidade de substratos metabólicos presentes no SFB, principalmente lipoproteínas (LDL e HDL), a capacidade esteroidogênica máxima das LCs bovinas mantidas *in vitro* é obtida quando adicionado SFB ao meio de cultivo. As LCs cultivadas em meio SFB-free, apesar de possuírem inicialmente uma quantidade considerável de colesterol intracelular (gotículas lipídicas citoplasmáticas), vão progressivamente perdendo essa reserva, devido à falta dos substratos presentes no SFB e, conseqüentemente, diminuindo sua produção de P4 (Pate e Condon, 1982, 1989; Pate e Nephew, 1988; Pate, 1993). Pate e Condon (1982), ao adicionarem LDL e HDL ao

meio de cultivo, observaram o incremento na produção da P4, sugerindo que esses são os fatores principais presente no SFB que influenciam aumentando a eficiência da esteroidogênese.

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

|              | Meio de cultivo    |                    |
|--------------|--------------------|--------------------|
|              | 10% SFB            | 10% SFB-free       |
| <b>Dia 1</b> | 831,1 <sup>a</sup> | 319,6 <sup>b</sup> |
| <b>Dia 7</b> | 44,0 <sup>a</sup>  | 6,8 <sup>b</sup>   |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

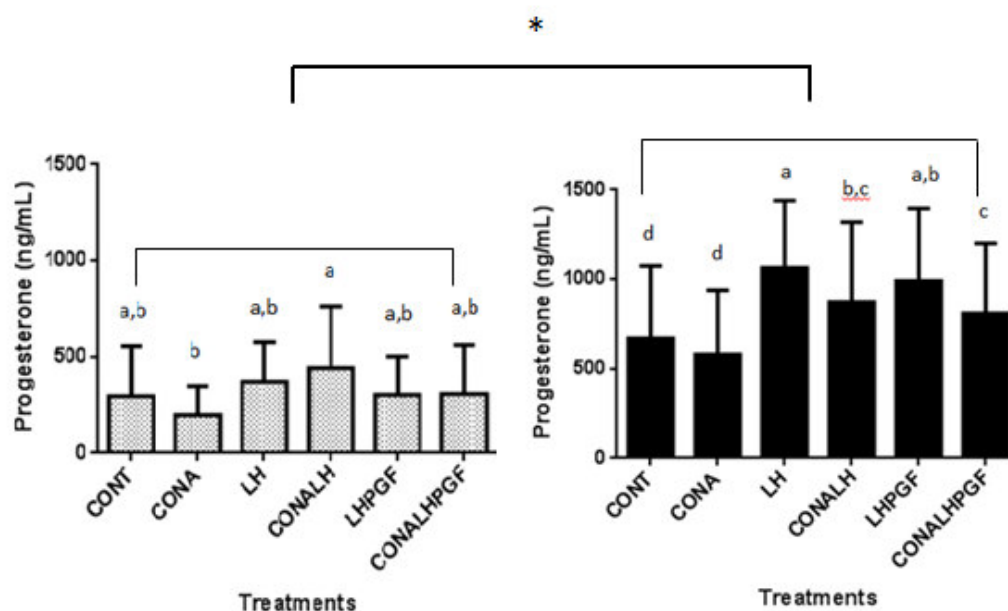
Foi observado efeito de tratamento na produção de P4 no D1 (Figura 1;  $P < 0,05$ ). Nos cultivos realizados na ausência de SFB, verificou-se maior secreção de P4 quando as LCs foram cultivadas na presença de CONA+LH. Nos cultivos com a presença de SFB os tratamentos Controle/SFB e CONA/SFB resultaram em menor produção de P4. O efeito depressor da CONA na secreção de P4 foi revertido quando adicionado LH ao meio, independente da presença de  $\text{PGF2}\alpha$ , contudo, as concentrações de P4 foram maiores quando as células foram cultivadas com LH sem a presença da CONA.

O incremento da esteroidogênese no tratamento LH/SFB provavelmente relaciona-se a maior disponibilidade das lipoproteínas oriundas do SFB (Nishimura et al., 2006) e aos efeitos atribuídos ao LH que relacionam-se ao aumento da disponibilidade do colesterol intracelular, via aumento da atividade da colesterol esterase, e aumento da eficiência do transporte do colesterol para o interior das mitocôndrias (Niswender et al., 2000).

Liptak et al. (2005) também observaram o efeito depressor da CONA sobre a secreção de P4 em LCs cultivadas *in vitro*. Contudo, como nesse estudo foi empregado um sistema de co-cultivo das LCs com ICs, em que as ICs haviam sido pré-sensibilizadas pela CONA ou que a CONA foi adicionada ao meio de co-cultivo, concluiu-se que a presença de CONA ou de ICs ativadas pela CONA, diminuem a secreção de P4 e atribuiu-se esse efeito às citocinas inflamatórias ( $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ) oriundas das ICs ativadas pela CONA. Talbott et al. (2014) também notaram a

diminuição da produção de P4 em co-cultivo de LCs e ICs na presença CONA, e verificaram que esse efeito estava associado ao aumento da expressão gênica da citocina inflamatória IL-8. Esses achados reforçam também as afirmações de outras equipes que citocinas derivadas das ICs inibem a produção luteínica de P4 (Benyo e Pate, 1992; Fairchild e Pate, 1989).

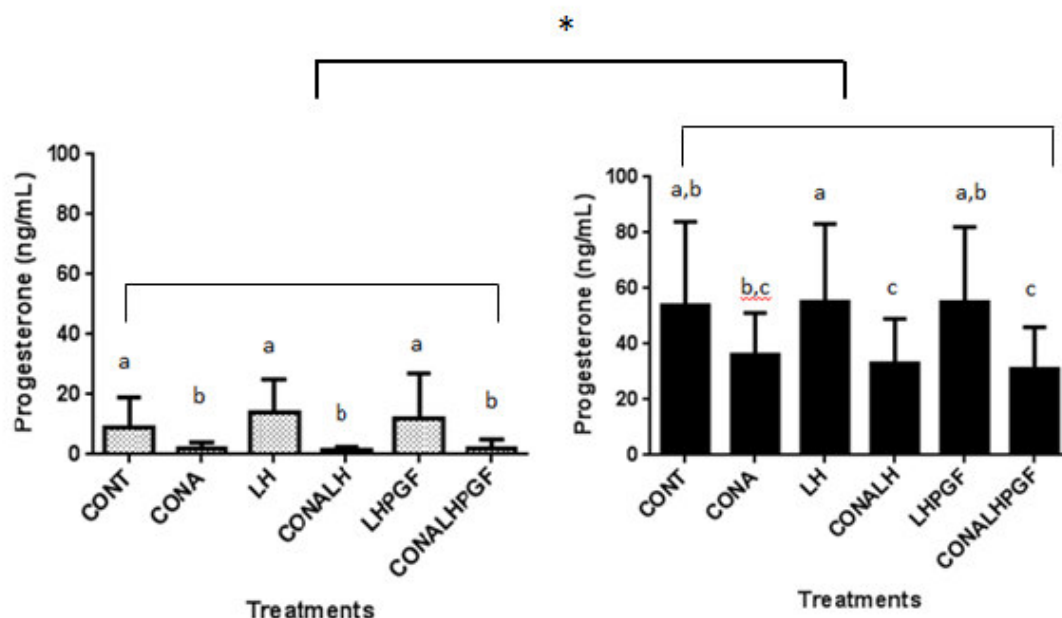
No entanto, como em nosso estudo foram empregadas exclusivamente LCs, os efeitos depressores observados não estão relacionados as ICs e provavelmente relacionam-se a ação direta da CONA sobre as LCs, confirmando a nossa hipótese. O LDL, importante substrato para a produção de colesterol intracelular possui em sua estrutura a apolipoproteína B, constituído em 4 - 9% de carboidratos, entre estes a manose que sabidamente possui afinidade pela CONA (Vauhkonen et al., 1985). Essa característica permite que a CONA ligue-se a LDL formando um complexo (Harmony e Cordes, 1975), o que provavelmente inviabiliza a ligação ao seu receptor na membrana nas LCs, impedindo sua internalização, e consequentemente o aporte de colesterol. Contudo, pouco se sabe da interação da CONA com a HDL, um importante substrato para a produção de colesterol.



**Figura 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).

Diferentes letras em cada barra indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ). \*Indica diferença estatística quando adicionado 10% SFB ( $P < 0,05$ ).

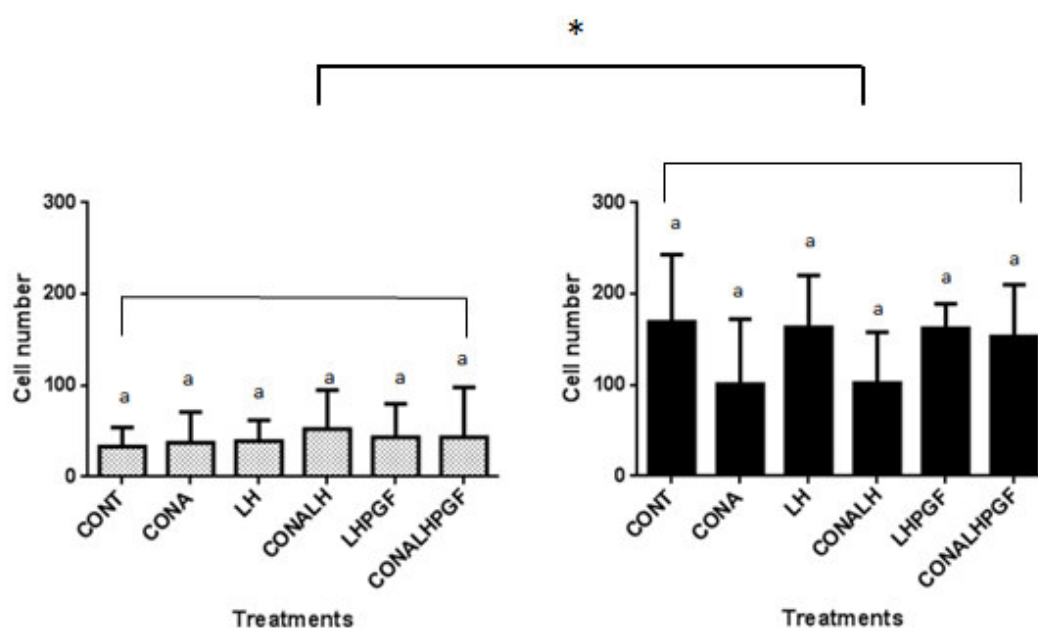
A produção de P4 no D7 também mostrou efeito de tratamento, sendo que, independente da adição ou não de SFB, as menores concentrações foram observadas na presença da CONA (Figura 2;  $P < 0,05$ ). Os efeitos depressores foram mais evidentes no cultivo SFB-free e provavelmente estão relacionados à afinidade da CONA com a LDL (Harmony e Cordes, 1975). Diferente do observado no D1 para os cultivos realizados na presença de SFB, a adição do LH no meio não aumentou a produção de P4, que se manteve a níveis semelhantes ao do controle. Esse efeito também já foi relatado por Jones et al. (1992) e está relacionado a redução da capacidade estimulatória do LH devido a diminuição do número de seus receptores presentes na membrana celular. Também de modo diferente o LH não foi capaz de reverter os efeitos supressores da CONA sobre a produção de P4, independente da presença ou não de SFB. A ausência da ação do LH provavelmente relaciona-se ao fato deste agir intracelularmente otimizando a disponibilidade e o transporte do colesterol, sem contudo interferir nos mecanismos de internalização de seus precursores (LDL/HDL) que estariam seriamente deprimidos pela ação da CONA.



**Figura 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).

Diferentes letras em cada barra indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ). \*Indica diferença estatística quando adicionado 10% SFB ( $P < 0,05$ ).

O número de células no D7 não mostrou efeito do tratamento ( $P > 0,05$ ); porém, quando adicionado 10% SFB o número foi maior ( $P < 0,05$ ; Figura 3), demonstrando que os tratamentos que o empregam resultam em maior estímulo à proliferação celular, o que praticamente não é observado quando as células são cultivadas em meio SFB-free (Pate, 1993). Resultados semelhantes foram obtidos por Goyeneche et al. (2006) que observaram o crescimento exponencial de LCs murinas cultivadas na presença de SFB, efeito que não foi observado na ausência do SFB. Os efeitos proliferativos do SFB no cultivo de LCs relacionam-se a sua capacidade de inibir a apoptose conforme observado por Goyeneche et al. (2006); HU et al. (2001; 2004); Skarzynski et al. (2007); Villavicencio et al. (2002).



**Figura 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). Diferentes letras em cada barra indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ). \*Indica diferença estatística quando adicionado 10% SFB ( $P < 0,05$ ).

Em resumo, o cultivo de LCs na presença de CONA diminuiu a capacidade secretória de P4 das LCs e o efeito é 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. Estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão da interação da CONA na produção de P4 pelas LCs na espécie bovina.

### **Agradecimentos**

A Universidade Estadual da Pensilvânia, University Park, PA, EUA. Ao suporte financeiro: Bolsa FAPESP 2013/00992-3, Auxílio FAPESP 2013/07439-8 a e Bolsa estágio no exterior FAPESP 2015/01940-2.

### **Conflito de interesse**

Os autores declararam que não há conflito de interesse.

### **Referências:**

- Benyo DF, Pate JL, 1992: Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* **130**, 854–860.
- Del Vecchio RP, Thibodeaux JK, Hansel W, 1995: Contact-associated interactions between large and small bovine luteal cells during the estrous cycle. *Domest. Anim. Endocrinol.* **12**, 25–33.
- Fairchild DL, Pate JL, 1989: Interferon-gamma induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* **40**, 453–457.
- Goyeneche A, Harmon JM, Telleria CM, 2006: Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. *Reproduction* **131**, 103–111. doi:10.1530/rep.1.00751
- Harmony JA, Cordes EH, 1975: Interaction of human plasma low density lipoprotein with concanavalin A and with ricin. *J. Biol. Chem.* **250**, 8614–8617.
- Hu CL, Cowan RG, Harman RM, Porter DA, Quirk SM, 2001: Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by Fas antigen (CD95) and Fas ligand. *Biol. Reprod.* **64**, 518–526.
- Hu CL, Cowan RG, Harman RM, Quirk SM, 2004: Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* **18**, 326–338.
- Jones LS, Ottobre JS, Pate JL, 1992: Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **85**, 33–39.
- Liptak AR, Sullivan BT, Henkes LE, Wijayagunawardane MPB, Miyamoto A, Davis JS, Rueda BR, Townson DH, 2005: Cooperative expression of monocyte

chemoattractant protein 1 within the bovine corpus luteum: evidence of immune cell-endothelial cell interactions in a coculture system. *Biol. Reprod.* **72**, 1169–1176.

Maalouf SW, Liu WS, Albert I, Pate JL, 2014: Regulating life or death: Potential role of microRNA in rescue of the corpus luteum. *Mol. Cell. Endocrinol.* **398**, 78–88.

McCracken JA, Schramm W, Barcikowski B, Wilson Jr L, 1981: identification of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha as a uterine luteolytic hormone and the hormonal control its synthesis. *Acta Vet. Scand.*

Nett TM, McClellan MC, Niswender GD, 197: Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol. Reprod.* **15**, 66–78.

Nishimura R, Sakumoto R, Tatsukawa Y, Acosta TJ, Okuda K, 2006: Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. *Endocrinology* **147**, 4273–4280.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW, 2000: Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* **80**, 1–29.

Pate JL, 1993: Isolation and culture of fully differentiated bovine luteal cells. *Methods Toxicol* **3**, 358–370.

Pate JL, Condon WA, 1989: Regulation of steroidogenesis and cholesterol synthesis by prostaglandin F-2 $\alpha$  and lipoproteins in bovine luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* **87**, 439–446.

Pate JL, Condon WA, 1982: Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **28**, 551–562.

Pate JL, Nephew KP, 1988: Effects of in vivo and in vitro administration of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on lipoprotein utilization in cultured bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* **38**, 568–576.

Prakash BS, Meyer HHD, Schallenberger E, Van de Wiel DFM, 1987: Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J. Steroid Biochem.* **28**, 623–627.

Skarzynski DJ, Shibaya M, Tasaki Y, Korzekwa A, Murakami S, Woclawek-Potocka I, Majewska M, Okuda K, 2007: Fas-mediated apoptosis is suppressed by calf serum in cultured bovine luteal cells. *Reprod. Biol.* **7**, 3–15.

Talbott H, Delaney A, Zhang P, Yu Y, Cushman R, Cupp AS, Hou X, Davis JS, 2014: Effects of IL8 and immune cells on the regulation of luteal progesterone secretion. *Reproduction* **148**, 21–31. doi:10.1530/REP-13-0602

Vauhkonen M, Vitala J, Parkkinen, J, Rauvala H, 1985: High-mannose structure of apolipoprotein-B from low-density lipoproteins of human plasma. *Eur. J. Biochem.* **152**,

43–50.

Villavicencio A, Iniguez G, Johnson MC, Gabler F, Palomino A, Vega M, 2002: Regulation of steroid synthesis and apoptosis by insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 in human corpus luteum during the midluteal phase. *Reproduction* **124**, 501–508.

## CAPÍTULO II

### **EFEITOS DA $\text{PGF}_{2\alpha}$ E DA INTERAÇÃO CELULAR NA PRODUÇÃO DE PROGESTERONA NO CULTIVO E CO-CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS DO CORPO LÚTEO BOVINO**

Este artigo será submetido à Revista **Ciência Rural** e encontra-se de acordo com as normas de submissão exigidas.

**Efeitos da PGF2 $\alpha$  e da interação celular na produção de progesterona no cultivo e co-cultivo *in vitro* de células do corpo lúteo bovino**

**Effects of PGF2 $\alpha$  and cell interaction on progesterone production on *in vitro* culture and co- culture of corpus luteum in cattle**

Flavia Caroline Destro<sup>1</sup>, Joy Lee Pate<sup>2</sup>, Ian Martin<sup>3</sup>, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga<sup>1</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>1</sup>

1 – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

2 – Departamento de Ciência Animal, Universidade Estadual da Pensilvânia (Penn State University), University Park, Pensilvânia, Estados Unidos.

3 – Universidade de Uberaba (Uniube), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

**RESUMO**

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina transitória responsável pela produção de progesterona (P4), hormônio imprescindível para a manutenção da gestação na espécie bovina. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da PGF2 $\alpha$  e das interações celulares na produção de P4 pelas células luteínicas esteroidogênicas (LCs) cultivadas ou co-cultivadas *in vitro*. No Experimento I, foram utilizados CLs pertencentes à fase média do ciclo estral (10-12 dias, n=4). No laboratório os CLs foram processados e as LCs foram cultivadas por 7 dias em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. As LCs receberam os respectivos tratamentos com ou sem hormônio luteinizante (LH, 100  $\mu$ g/mL): controle; PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL); PGF2 $\alpha$  (100 ng/mL); PGF2 $\alpha$  (354,5 ng/mL). 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. As amostras que receberam LH apresentaram maior produção de P4, e a administração de diferentes doses de PGF2 $\alpha$  não mostrou alteração no padrão de secreção de P4. No Experimento II, foram utilizados CLs pertencentes à fase média do ciclo estral (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 7 dias em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram divididas nos respectivos grupos com ou sem PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL): 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 PGF2 $\alpha$  no cultivo e co-cultivo das células do CL. Pode-se concluir que há a necessidade de uma maior adequação na metodologia de cultivo e co-cultivo *in vitro* das células do CL bovino, frente ao desafio com a PGF2 $\alpha$ , a fim de se representar um modelo fisiológico da funcionalidade do CL *in vitro* na espécie bovina.

Palavras-chave: corpo lúteo, progesterona, prostaglandina F2 $\alpha$ , cultivo celular

### ABSTRACT

Corpus luteum (CL) is a transient endocrine gland responsible for the production of progesterone (P4), the hormone essential for the maintenance of pregnancy in cattle. The aim of this study was to evaluate the effect of PGF2 $\alpha$  and cellular interactions in the production of P4 by steroidogenic luteal cells (LCs) cultured or co-cultured *in vitro*. In experiment I, 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 7 days in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The LCs received the respective treatments: Control; PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL); PGF2 $\alpha$  (100 ng/mL); PGF2 $\alpha$  (354,5 ng/mL); LH (100  $\mu$ g/mL); PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL) + LH (100  $\mu$ g/mL); PGF2 $\alpha$  (100 ng/mL) + LH (100  $\mu$ g/mL); PGF2 $\alpha$  (354,5 ng/mL) + LH (100  $\mu$ g/mL). 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. The samples that received LH produced more P4, and the administration of different doses of PGF2 $\alpha$  showed no change in P4 secretion. In Experiment II, 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 7 days in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The groups were divided into: Control: LC on bottom of the plate; LC + PGF2 $\alpha$  (10 ng / ml): LC on bottom of the plate; Control: EC on bottom of the plate; EC + PGF2 $\alpha$  (10 ng / mL): EC on bottom of the plate; Co-culture: LC + EC + IC on bottom of the plate; Co-culture + PGF2 $\alpha$  (10 ng / mL): LC + EC + IC on bottom of the plate; LC (bottom of the plate) + EC + IC (inside the insert); LC (bottom of the plate) + EC + IC (inside the insert) + PGF2 $\alpha$  (10 ng / ml); EC (bottom of the plate) + LC + IC (inside the insert); EC (bottom of the plate) + IC + LC (interior of the insert) + PGF2 $\alpha$  (10 ng / ml). It was not observed variation in the

production of P4 when added PGF2 $\alpha$  in culture and co-culture of cells from CL. It can be concluded that there is a need for further methodological adjustments in *in vitro* culture and co-culture of cells from bovine CL challenged with PGF2 $\alpha$ , in order to represent physiological model of the CL functionality in cattle.

Keywords: corpus luteum, cell culture, concanavalin-A, F2 $\alpha$  prostaglandin, progesterone

## INTRODUÇÃO

O CL é uma glândula endócrina transitória formada pela ruptura do folículo ovulatório, cuja função primordial é a produção de P4, responsável pela preparação do endométrio para implantação embrionária e manutenção da gestação na espécie bovina (MILVAE; HINCKLEY; CARLSON, 1996; MILVAE, 2000). O CL apresenta períodos regulares de formação, desenvolvimento e regressão marcados por intensas remodelações teciduais, caracterizadas pela proliferação, migração, diferenciação e morte celular. O CL possui populações heterogêneas de células com características morfofuncionais e bioquímicas distintas, classificadas como células esteroidogênicas e não-esteroidogênicas (Revisado por MARTIN; FERREIRA, 2009).

O hormônio luteinizante (LH) tem grande impacto sobre a vida útil do CL e da secreção de P4 (KARSCH et al., 1971). Trabalhos demonstraram que o LH promove o crescimento luteínico e estimula a produção de P4 *in vivo* (NISWENDER et al., 1976) e *in vitro* (ARMSTRONG; BLACK, 1966; HANSEL; SNOOK, 1970). Na ausência de um embrião viável, ocorre a liberação de múltiplos pulsos de PGF2 $\alpha$ , acarretando na regressão do CL (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999). As células imunes (ICs) estão presentes no CL no momento da luteólise, e são mediadoras da regressão estrutural, podendo também contribuir para a redução da capacidade esteroidogênica (NDIAYE et al., 2012; PATE; KEYES, 2001; PATE et al., 2010).

A PGF2 $\alpha$  e seus análogos farmacológicos agem *in vivo*, como agentes luteolíticos (ATLI et al., 2012; KORZEKWA et al., 2008; NISWENDER et al., 2000; TREVISOL et al., 2015). Entretanto, em cultivo *in vitro* de fragmentos de tecido luteínico e de LCs, a PGF2 $\alpha$  provocou aumento na produção de P4, (BAH et al., 2006; KORZEKWA et al., 2008, 2004; MIYAMOTO et al., 1993; OKUDA et al., 1998; SHIRASUNA et al., 2004). Em contraste, O'GRADY et al., (1972) demonstraram que a PGF2 $\alpha$  foi capaz de inibir a produção basal de P4 no cultivo *in vitro* de fragmentos de tecido luteínico de coelhos e ratos. WRIGHT et al. (1980) e FLETCHER e

NISWENDER (1982) notaram que a  $\text{PGF2}\alpha$  não teve efeito na produção de P4 quando adicionada no cultivo *in vitro* de LCs de fragmentos de CL.

As técnicas de cultivo e co-cultivo *in vitro* são ferramentas alternativas, e vêm sendo empregadas no estudo da funcionalidade das células do CL, com objetivos e metodologias variadas ao longo dos anos (CANNON; PATE, 2006; KIM et al., 2006; KORZEKWA et al., 2008, 2004; NDIAYE et al., 2012; PATE; CONDON, 1982, 1989; PATE; NEPHEW, 1988; SHIBAYA et al., 2005; WILTBANK et al., 1990). Os métodos de cultivo variam entre laboratórios e dependem de cada ensaio em específico, do tempo de cultivo, do tipo de células a ser cultivado, e dos parâmetros a serem avaliados (BATISTA, 2011).

Devido à importância do CL, os estudos da sua função e componentes celulares são fundamentais para a melhor compreensão dos processos envolvidos no ciclo reprodutivo. Contudo, os estudos *in vivo* necessitam de grandes investimentos logísticos e econômicos. Nesse contexto, o cultivo celular têm se mostrado uma possibilidade alternativa para o estudo da função celular, da luteogênese e da luteólise.

No presente estudo, nós determinamos a influência direta da  $\text{PGF2}\alpha$  na secreção de P4 em diferentes condições experimentais, cultivo e co-cultivo de células do CL bovino. O Objetivo do Experimento I, foi determinar o efeito diferentes doses de  $\text{PGF2}\alpha$  na produção de P4 no cultivo homogêneo de LCs. O objetivo do Experimento II, foi avaliar o efeito das interações celulares e da  $\text{PGF2}\alpha$  no co-cultivo de LCs, ECs e ICs na produção de P4.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Experimento I. Efeito de diferentes doses de $\text{PGF2}\alpha$ na secreção de progesterona pelas células luteínicas esteroidogênicas bovina**

#### **Coleta de corpo lúteo**

Todos os procedimentos com o uso de animais foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de ética da Universidade Estadual da Pensilvânia (Penn State University). Foram utilizadas vacas da raça holandesa, preto e branco, não lactantes, com idade entre 4 e 8 anos, com ciclo estral regular. Os CLs pertencentes à fase média (10-12 dias após a ovulação) foram coletados por enucleação transvaginal.

Imediatamente após a remoção, o CL foi acondicionado em meio de cultivo Ham's F-12 (Gibco, Invitrogen Corporation) contendo 20 µg/mL de gentamicina (Gentamicin Reagent Solution; Invitrogen Corporation) e levados até o laboratório em caixa de transporte contendo gelo para posterior processamento.

### **Cultivo de células luteínicas esteroideogênicas**

A dissociação do tecido luteínico e o cultivo das LCs foram realizados como descritos previamente por PATE (1993). Após a remoção do tecido conectivo, os CLs foram divididos em quatro partes, cortados em tamanhos pequenos e adicionados em meio de cultivo Ham's F-12 suplementado com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, A9056), 20 µg/mL de gentamicina, e 2000 U/g de colagenase tipo 1 (Worthington Biochemical Corporation, LS004196) para digestão enzimática. O conteúdo foi transferido para um becker com agitador magnético e incubado por 60 minutos em banho-maria a 37°C, com agitação em baixa velocidade. Durante os primeiros 60 minutos de incubação, as células foram vigorosamente aspiradas a cada 10 minutos com o auxílio de uma pipeta, para facilitar a dissociação tecidual. Passada à 1ª hora de digestão enzimática, o sobrenadante contendo LCs foi centrifugado (208 g/10 minutos) e acondicionados em uma caixa com gelo. O *pellet* foi ressuspensionado em 10 mL de meio de cultivo Ham's F-12 contendo gentamicina. Os fragmentos de tecidos não digeridos na primeira digestão, foram novamente incubados em solução com colagenase por mais 60 minutos a 37°C. Terminada à 2ª hora de dissociação, a solução contendo células foi lavada três vezes com centrifugações repetidas (2.5, 1.1 e 0.2 g por 10 minutos), com meio de cultivo Ham's F-12 contendo gentamicina. As LCs foram ajustadas a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL. As placas de cultivo foram pré-incubadas com meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino por no mínimo 30 minutos, depois foram lavadas com meio Ham's F-12 contendo gentamicina. Todos os estudos *in vitro* foram realizados em sistema de cultivo livre de soro fetal bovino, desenvolvido e validado no Laboratório de Cultivo celular, Departamento de Ciência Animal, Universidade Estadual da Pensilvânia. As LCs foram incubadas em meio de cultivo Ham's F-12 e 20 µg/mL de gentamicina, suplementadas com ITS<sup>TM</sup> Premix (insulina 5 mg/mL; transferrina 5 mg/mL; selênio 5 ng/mL; Corning, Ref.354351). As células foram cultivadas por 7 dias. No dia zero (D0) as células foram incubadas com os respectivos tratamentos. Passado 24 horas, o meio de cultivo foi removido e armazenado para posterior dosagem de P4. O mesmo procedimento foi

repetido nos dias 3 (D3) e dias 5 (D5). Cada placa de cultivo foi considerada replicata e os procedimentos foram repetidos por quatro vezes (n=4 corpos lúteos).

Simultaneamente, as células receberam nos D0, D1, D3 e D5 de cultivo os respectivos tratamentos com diferentes doses de PGF2 $\alpha$  (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, P5069):

Controle; PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL); PGF2 $\alpha$  (100 ng/mL); PGF2 $\alpha$  (354,5 ng/mL); LH (100  $\mu$ g/mL); PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL) + LH (100  $\mu$ g/mL); PGF2 $\alpha$  (100 ng/mL) + LH (100  $\mu$ g/mL); PGF2 $\alpha$  (354,5 ng/mL) + LH (100  $\mu$ g/mL).

As células foram incubadas a 38°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Amostras de meio de cultivo foram coletadas nos D1 e D7 e armazenadas a -20°C até a dosagem de P4.

## **Experimento II. Co-cultivo de células luteínicas esteroidogênicas, células luteínicas endoteliais e células imunes. Efeitos da PGF2 $\alpha$ e das interações celulares na produção de P4.**

### **Isolamento das células luteínicas esteroidogênicas**

As LCs foram isoladas enzimaticamente como descrito previamente no Experimento I. O sobrenadante obtido durante o isolamento das LCs foi utilizado para coleta de ECs e ICs. As LCs foram suspensas em meio de cultivo a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL.

### **Isolamento das células luteínicas endoteliais**

As ECs foram isoladas a partir do sobrenadante durante o isolamento das LCs. Para o isolamento das ECs o sobrenadante foi centrifugado três vezes por 10 minutos (300 g a 4°C). No intervalo de cada centrifugação, as células foram filtradas em filtros medindo 15  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, respectivamente. Foi adicionado delicadamente 4 mL de Ficoll (GE<sup>®</sup>, 17-1440-02) em 3 mL da solução contendo células que em seguida foi centrifugada por 30 minutos (675 g em temperatura ambiente). Após a centrifugação apenas a camada média foi coletada e novamente centrifugada três vezes por 10 minutos (300 g a 4°C). O *pellet* formado foi ressuspensionado em meio de cultivo Ham's F-12 e 20  $\mu$ g/mL de gentamicina a uma concentração de  $0,6 \times 10^5$  células/mL.

### **Isolamento das células do sistema imune**

As ICs foram isoladas a partir do sobrenadante durante o isolamento das LCs. Para o isolamento das ICs o sobrenadante foi centrifugado três vezes por 10 minutos (300 g a 4°C). O *pellet* foi ressuspensionado em meio Ham's F-12 contendo 20 µg/mL de gentamicina, incubadas por 30 minutos a 4°C, com anticorpo primário CD45+ (mouse anti-bovine, clone CACTB51A, IgG2a, WSU# BOV2039). Após a incubação, as células foram centrifugadas três vezes por 10 minutos (300 G a 4°C). Para isolamento das ICs foi utilizado microbeads (Goat anti-mouse IgG2a+b microbeads, Miltenyi Biotech) e incubadas por 30 minutos a 4°C. Após a 2ª incubação, as células foram filtradas em filtro de 30 µM (Miltenyi Biotech) e separadas a partir da fração positiva com o auxílio do aparelho AutoMACS® Pro separator (Miltenyl Biotec). A concentração de ICs utilizada foi de  $0,2 \times 10^5$  células/mL.

#### **Co-cultivo das células luteínicas esteroidogênicas, células luteínicas endoteliais e células do sistema imune**

O experimento foi conduzido em placa de cultivo de 24 poços (Corning®, CLS3524). Previamente à incubação, as placas de cultivo foram pré-incubadas com meio suplementado com 10% de soro fetal bovino por no mínimo 30 minutos, depois foi lavado com meio Ham's F-12 contendo 20µg/mL de gentamicina. O experimento foi desenvolvido em sistema de cultivo livre de soro fetal bovino.

As células foram co-cultivadas na proporção 1:1 de meio de cultivo Ham's F-12 e meio de cultivo EGM-2 Bullet Kit (CC 3162; 1/1), 20 µg/mL de gentamicina, suplementadas com ITS™ Premix. As células foram co-cultivadas por 7 dias. No dia zero (D0) as células foram incubadas com os respectivos tratamentos. Passadas 24 horas, o meio de cultivo foi removido e armazenado, para posterior dosagem de P4. Em seguida, meio de cultivo fresco foi adicionado. O mesmo procedimento foi repetido nos D3 e D5. Cada placa de cultivo foi considerada replicata e os procedimentos foram repetidos por quatro vezes (n=4 corpos lúteos).

O co-cultivo foi realizado usando combinações dos três tipos celulares isolados (LC, EC, IC) com ou sem PGF2α (Sigma Aldrich®, P5069) e com ou sem insertos para cultivo celular (BD Falcon®, 353097). As células receberam nos D0, D1, D3 e D5 de cultivo os respectivos tratamentos:

Controle: LC no fundo da placa; LC + PGF2α (10 ng/mL): LC no fundo da placa;

Controle: EC no fundo da placa; EC + PGF2α (10 ng/mL): EC no fundo da placa;

Co-cultivo: LC+EC+IC no fundo da placa; Co-cultivo + PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL): LC+EC+IC no fundo da placa; LC (fundo da placa) + EC+IC (interior do inserto); LC (fundo da placa) + EC+IC (interior do inserto) + PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL); EC (fundo da placa) + LC +IC (interior do inserto); EC (fundo da placa) + LC +IC (interior do inserto) + PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL).

As células foram incubadas a 38°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Amostras de meio de cultivo foram coletadas nos D1 e D7 e armazenadas a -20°C até a dosagem de P4.

### **Dosagem de progesterona**

A concentração de P4 foi mensurada no meio nos D1 e D7 de cultivo utilizando a técnica de enzaimunoensaio direto (EIA) como descrito previamente por (PRAKASH et al., 1987) com diluição final no D1 (1:300) e no D7 (1:10). A HRP-P4 foi usada em uma concentração final de 1:75.000. A curva padrão variou entre 0,39 e 100 ng/mL e a dose efetiva para 50% de inibição do ensaio (ED 50) foi de 4.5 ng/mL. A absorbância foi mensurada pelo leitor (VICTOR3, Perkin Elmer. Co) e as concentrações de P4 apresentadas em ng/mL. O coeficiente de variação (CV) intra e inter-ensaio foram 5,5% e 8,5%, respectivamente.

### **Análise estatística**

A análise estatística dos efeitos do experimento, tratamentos e concentração de P4 no meio de cultivo (Experimento I e II; média $\pm$ SEM), foram analisados utilizando two-way ANOVA seguido por teste de múltiplas comparações (Teste de Tukey ANOVA; Graphpad Prism). Foram consideradas com significância estatística quando  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Experimento I. Efeito de diferentes doses de PGF2 $\alpha$ na secreção de progesterona pelas células luteínicas esteroidogênicas bovina**

A produção de P4 foi mais alta no D1 (493,3 ng/mL) quando comparada ao D7 de cultivo

(30,6 ng/mL;  $P < 0,05$ ). A produção de P4 no D1 foi referente a 24 horas de cultivo, já no D7 correspondeu a um acumulado de 48 horas, ou seja, a concentração no D7 representa o dobro da concentração real.

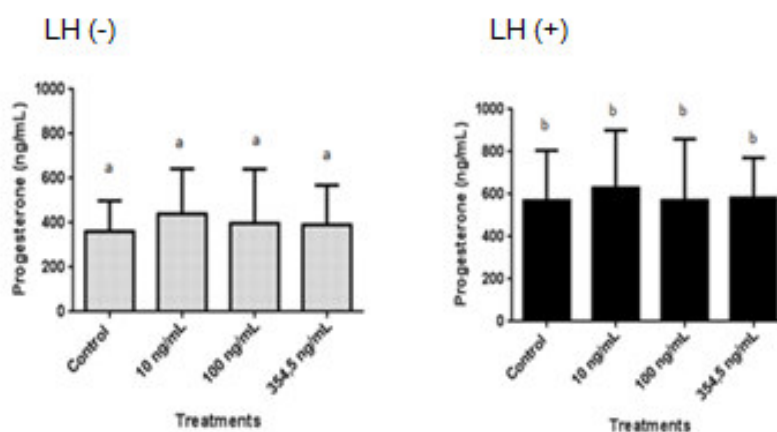
A concentração de P4 no D1 e D7 nos grupos que receberam LH (100  $\mu$ g/mL) foi maior que no grupo que não recebeu LH ( $P < 0,05$ ; Tabela 1).

**Tabela 1.** Média e erro padrão da concentração de progesterona nos D1 e D7 de cultivo de células luteínicas esteroidogênicas para amostras com LH (100  $\mu$ g/mL) e sem LH.

|              | Meio de cultivo    |                    |
|--------------|--------------------|--------------------|
|              | Com LH             | Sem LH             |
| <b>Dia 1</b> | 588,7 <sup>a</sup> | 397,8 <sup>b</sup> |
| <b>Dia 7</b> | 36,1 <sup>a</sup>  | 23,4 <sup>b</sup>  |

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

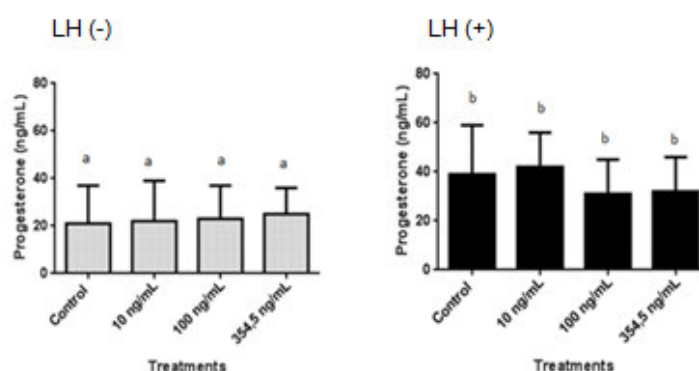
O uso de diferentes doses de PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL, 100 ng/mL e 354,5 ng/mL) no início do cultivo (D1) não causou alteração nas concentrações de P4, quando comparadas as do grupo controle ( $P > 0,05$ ; Figura 1).



**Figura 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 $\alpha$  na ausência (painel esquerdo/barras cinza) ou presença de LH (painel direito/barras preta).

O uso de diferentes doses de PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL, 100 ng/mL e 354,5 ng/mL) no D7 de cultivo também não causou alteração nas concentrações de P4, quando comparada ao grupo controle ( $P>0,05$ ; Figura 2).



**Figura 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 $\alpha$  na ausência (painel esquerdo/barras cinza) ou ausência de LH (painel direito/barras preta).

## **Experimento II. Co-cultivo de células luteínicas esteroidogênica (LCs), células luteínicas endoteliais (ECs) e células imunes (CI). Efeitos da PGF2 $\alpha$ e das interações celulares na produção de progesterona.**

A produção de P4 foi maior no D1 (426,9 ng/mL) quando comparada ao D7 de cultivo (253,2 ng/mL;  $P<0,05$ ). A produção de P4 no D1 foi referente a 24 horas de cultivo, já no D7 correspondeu a um acumulado de 48 horas, ou seja, a concentração para o D7 representa o dobro da concentração real.

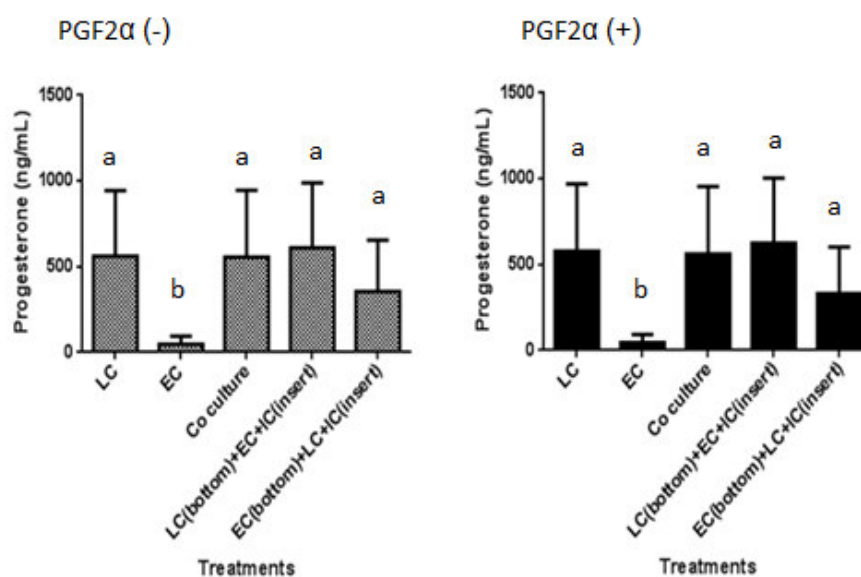
Não foi observada alteração (aumento ou diminuição) da concentração de P4 no D1 e no D7 nas amostras que receberam PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL;  $P>0,05$ ; Tabela 2).

**Tabela 2.** Média e erro padrão da concentração de progesterona nos D1 e D7 de cultivo para amostras tratadas com PGF2 $\alpha$  (10 ng/mL) ou sem PGF2 $\alpha$ .

|              | Meio de cultivo    |                    |
|--------------|--------------------|--------------------|
|              | Com PGF2 $\alpha$  | Sem PGF2 $\alpha$  |
| <b>Dia 1</b> | 428,2 <sup>a</sup> | 425,6 <sup>a</sup> |
| <b>Dia 7</b> | 256,5 <sup>b</sup> | 249,8 <sup>b</sup> |

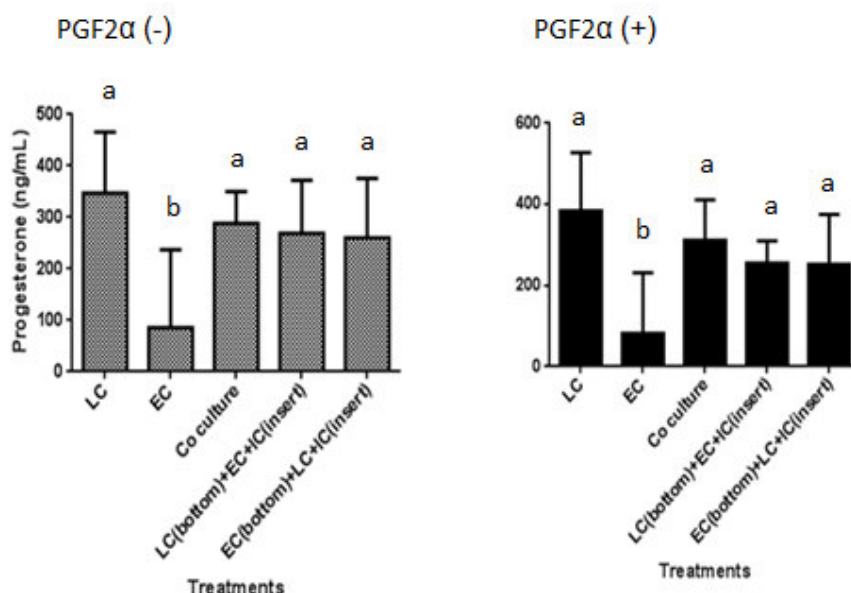
Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $P<0,05$ ).

Não foi observada variação na concentração de P4 entre os diferentes tipos celulares e tratamentos empregados, com exceção as amostras cultivadas apenas com EC e EC + PGF2 $\alpha$  ( $P<0,05$ ). Amostras cultivadas apenas com EC e EC + PGF2 $\alpha$  apresentaram concentrações de P4 menores (Figura 3 e 4).



**Figura 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 $\alpha$ ; Painel direito/barras preta: Presença de PGF2 $\alpha$ .

Não foi observado alteração na concentração de P4 no cultivo celular homogêneo (um tipo celular) ou co-cultivo celular (três tipos celulares), com ou sem o uso de insertos para cultivo celular.



**Figura 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. Pannel esquerdo/barras cinza: Ausência de PGF2 $\alpha$ ; Pannel direito/barras preta: Presença de PGF2 $\alpha$ .

## DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no estudo demonstram que a produção de P4 foi maior no início (D1) do cultivo do que no final (D7), sinalizando uma perda importante da capacidade esteroideogênica luteínica ao longo do cultivo fenômeno bem documentado em outros estudos *in vitro* de LCs obtidas de CL da fase média (DEL VECCHIO; THIBODEAUX; HANSEL, 1995; PATE; CONDON, 1982). Resultados semelhantes foram observados por outras equipes, em que LCs pertencentes também à fase média, apresentaram decréscimo na produção de P4 ao longo do cultivo (DEL VECCHIO et al., 1995; PATE; CONDON, 1982). Segundo PATE (1993) no início do cultivo as LCs contêm quantidade considerável de grânulos lipídicos no interior do citoplasma, contudo, se não houver adição de soro fetal bovino ou de lipoproteínas no meio, essas células perdem o estoque intracelular de colesterol e consequentemente a

produção de P4 diminui com o decorrer do cultivo. Assim, a capacidade esteroidogênica *in vitro* dessas células, mostra-se diferentes da que observamos *in vivo*, visto que as células devem se adaptar completamente a um novo ambiente, interagir ativamente com um substrato e se manter com a configuração morfológica anormal.

O LH é imprescindível para o desenvolvimento luteínico na espécie bovina (NISWENDER et al., 2000). Em nosso estudo, a adição de LH no cultivo de LCs da fase média levou a uma maior produção de P4. O íntimo contato entre as células luteínicas pequenas (SLC) e as células luteínicas grandes (LLC) resultam em maior secreção de P4 em resposta ao LH quando comparado ao cultivo em que não há interação entre esses dois tipos celulares (DEL VECCHIO et al., 1995; KAMADA; IKUMO, 1997; KORZEKWA et al., 2008, 2004; OKUDA et al., 1998; WIESAK; HARDIN; FOXCROFT, 1994). (REDMER et al. (1991), observaram a presença de junções do tipo gap em cultivo de LCs e descreveram a íntima comunicação entre as SLC e as LLC em cultivo, esses mesmos autores observaram também que a comunicação entre as células foi maior quando estimuladas com LH.

Esperava-se que o tratamento com doses diferentes de PGF2 $\alpha$  nos D1 e D7, apresentassem alterações na produção de P4, contudo esse efeito não foi observado em nosso estudo. Muitos autores relataram que a PGF2 $\alpha$  e seus análogos farmacológicos provocam aumento da produção de P4 em cultivo *in vitro* de LCs (BAH et al., 2006; KORZEKWA et al., 2008, 2004; OKUDA et al., 1998; SHIRASUNA et al., 2004). OKUDA et al. (1998) e KORZEKWA et al. (2004), trabalharam com doses distintas de PGF2 $\alpha$  e notaram que quanto maior a concentração de PGF2 $\alpha$  utilizada, maior foi o incremento na produção de P4. Em contraste, a PGF2 $\alpha$  causou diminuição na secreção de P4 no cultivo de LCs de ovinos e bovinos, respectivamente (FITZ et al., 1984; PATE; CONDON, 1989) ou não teve efeito direto sobre a secreção de P4 no cultivo de LCs (SKARZYNSKI; OKUDA, 1999).

A possível razão para os diversos efeitos da PGF2 $\alpha$  observada nos estudos, pode estar nos diferentes sistemas de cultivo empregados pelas equipes. Para diferenciar do sistema de cultivo em monocamada utilizada no estudo de OKUDA et al. (1998); TSAI; WILTBANK (1997) e SEN et al. (2005) realizaram seus experimentos com LCs em suspensão incubadas com agitação constante. Segundo SHIBAYA et al. (2005), as LCs cultivadas em sistema de suspensão permanecem em contato, mantém a integridade do citoesqueleto e a morfologia original durante o cultivo. Portanto, o cultivo de LCs em monocamada pode não representar o real funcionamento das células. Outro

agravante seria a falha das células cultivadas em monocamada em secretar hormônios e responder a substâncias externas devido à ausência da interação célula-célula (SHIBAYA et al., 2005).

No nosso estudo não foi observado variação na secreção de P4 entre as diferentes metodologias empregadas no experimento II, com ou sem o uso da PGF2 $\alpha$ . Diversas equipes observaram diferentes efeitos da estimulação com PGF2 $\alpha$  na secreção de P4 no co-cultivo em monocamada das células do CL bovino. KORZEKWA et al. (2008) observaram que a administração de altas doses de PGF2 $\alpha$  aumentou a secreção de P4 no cultivo de LC, contudo esse aumento não foi observado no cultivos homogêneos de EC ou IC. Um fato interessante observado por essa equipe foi a diminuição acentuada da secreção de P4 no co-cultivo de LC, EC e IC tratadas com PGF2 $\alpha$ .

Os resultados apresentados por KORZEKWA et al. (2008) corroboram com estudos anteriores, que indicam que, apesar de PGF2 $\alpha$  ser o principal fator luteolítico *in vivo*, a ação luteolítica no CL requer a participação de produtos das demais células presentes no CL, além das LCs (BECKMAN et al., 2006; DAVIS; RUEDA; SPANEL-BOROWSKI, 2003; OKUDA, 2004; PATE, 1996; PETROFF; PETROFF; PATE, 2001; SKARZYNSKI et al., 2003). Segundo KORZEKWA et al. (2008), para mostrar o efeito inibitório direto e o mecanismo da PGF2 $\alpha$  sobre a produção de P4 pelas LCs, é importante utilizar diferentes metodologias de cultivo que consistam não só de células esteroideogênicas, mas também de células não-esteroideogênicas.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados nesse estudo, conclui-se que a produção de P4 foi maior no início do cultivo. No Experimento I, o LH resultou no incremento da produção de P4, contudo a administração de diferentes doses de PGF2 $\alpha$  não alterou o padrão de secreção pelas LCs. No experimento II, também não foi observado variação na produção de P4, quando adicionado PGF2 $\alpha$ . As diferentes técnicas de cultivo e co-cultivo empregadas não foram capazes de representar um modelo fisiológico da funcionalidade do CL *in vitro*. Portanto, há a necessidade de um número maior de estudos, a fim de esclarecer a ação da PGF2 $\alpha$  na produção de P4 *in vitro*.

## REFERÊNCIAS:

- ARMSTRONG, D. T.; BLACK, D. L. Influence of Luteinizing Hormone on Corpus Luteum Metabolism and Progesterone Biosynthesis Throughout the Bovine Estrous Cycle<sup>1</sup>. **Endocrinology**, v. 78, n. 5, p. 937–944, 1966.
- ATLI, M. O. et al. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F<sub>2</sub>α. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 4, p. 130, abr. 2012.
- BAH, M. M. et al. Role of intraluteal prostaglandin F<sub>2</sub>α, progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 79, n. 3, p. 218–229, 2006.
- BATISTA, M. R. Faculdade de Medicina Veterinária. 2011.
- BECKMAN, J. D. et al. Isolation and characterization of ovine luteal pericytes and effects of nitric oxide on pericyte expression of angiogenic factors. **Endocrine**, v. 29, n. 3, p. 467–476, 2006.
- CANNON, M. J.; PATE, J. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase participates in the interferon-gamma-induced cell death process in cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 3, p. 552–9, mar. 2006.
- DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R.; SPANEL-BOROWSKI, K. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, n. 1, p. 89, 2003.
- DEL VECCHIO, R. P. et al. Interactions between large and small luteal cells collected during the mid- or late-luteal stages of the bovine oestrous cycle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 7, n. 1, p. 35–40, jan. 1995.
- DEL VECCHIO, R. P.; THIBODEAUX, J. K.; HANSEL, W. Contact-associated interactions between large and small bovine luteal cells during the estrous cycle. **Domestic animal endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 25–33, 1995.
- FITZ, T. A. et al. Interactions of prostaglandins with subpopulations of ovine luteal cells. II. Inhibitory effects of PGF<sub>2</sub>α and protection by PGE<sub>2</sub>. **Prostaglandins**, v. 28, n. 1, p. 127–138, 1984.
- FITZ, T. A. et al. Effects of individual and combined treatment with prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub>α on progesterone secretion by ovine luteal cells supplemented with homologous serum lipoproteins in vitro. **Biology of reproduction**, v. 48, n. 3, p. 662–668, 1993.
- FLETCHER, P. W.; NISWENDER, G. D. Effect of PGF<sub>2</sub>α on progesterone secretion and adenylate cyclase activity in ovine luteal tissue. **Prostaglandins**, v. 23, n. 6, p. 803–818, 1982.
- GIRSH, E. et al. Effect of endothelin-1 on bovine luteal cell function: role in prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced antisteroidogenic action. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1306–1312, 1996.
- GIRSH, E.; GREBER, Y.; MEIDAN, R. Luteotrophic and luteolytic interactions between bovine

small and large luteal-like cells and endothelial cells. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 4, p. 954–62, abr. 1995.

HANSEL, W.; SEIFART, K. H. Maintenance of luteal function in the cow. **Journal of dairy science**, v. 50, n. 12, p. 1948–1958, 1967.

HANSEL, W.; SNOOK, R. B. Pituitary ovarian relationships in the cow. **Journal of dairy science**, v. 53, n. 7, p. 945–961, 1970.

HARRISON, L. M.; KENNY, N.; NISWENDER, G. D. Progesterone production, LH receptors, and oxytocin secretion by ovine luteal cell types on days 6, 10 and 15 of the oestrous cycle and day 25 of pregnancy. **Journal of reproduction and fertility**, v. 79, n. 2, p. 539–548, 1987.

HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A. Angiotensin II interacts with prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and endothelin-1 as a local luteolytic factor in the bovine corpus luteum in vitro. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1104–1109, 1999.

KALTENBACH, C. C. et al. Effect of pituitary hormones on progesterone synthesis by ovine luteal tissue in vitro. **Endocrinology**, v. 81, n. 6, p. 1407–1409, 1967.

KALTENBACH, C. C. et al. Effect of hypophysectomy on the formation and maintenance of corpora lutea in the ewe. **Endocrinology**, v. 82, n. 4, p. 753–759, 1968.

KAMADA, H.; IKUMO, H. Effect of selenium on cultured bovine luteal cells. **Animal reproduction science**, v. 46, n. 3-4, p. 203–11, abr. 1997.

KARSCH, F. J. et al. Prolonged maintenance of the corpus luteum of the ewe by continuous infusion of luteinizing hormone. **Biology of reproduction**, v. 4, n. 2, p. 129–136, 1971.

KIM, I. et al. A CIDR-based timed AI protocol can be effectively used for dairy cows with follicular cysts. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p. 206–213, 2006.

KINDAHL, H. et al. The release of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  as reflected by 15-keto-13, 14-dihydroprostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. **Prostaglandins**, v. 11, n. 5, p. 871–878, 1976.

KORZEKWA, A. J. et al. Luteolytic effect of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on bovine corpus luteum depends on cell composition and contact. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 4, p. 464–472, 2008.

KORZEKWA, A. et al. Effects of prostaglandin F(2 $\alpha$ ) and nitric oxide on the secretory function of bovine luteal cells. **J Reprod Dev**, v. 50, n. 4, p. 411–417, 2004.

MAAS, S. et al. Paracrine actions of oxytocin, prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$ , and estradiol within the human corpus luteum. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 306–312, 1992.

MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Fisiologia da ovulação e da formação do corpo lúteo bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 270–279, 2009.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological reviews**, v. 79, n. 2, p. 263–323, 1999.

- MICHAEL, A. E.; ABAYASEKARA, D. R. E.; WEBLEY, G. E. The luteotrophic actions of prostaglandins E2 and F2 $\alpha$  on dispersed marmoset luteal cells are differentially mediated via cyclic AMP and protein kinase C. **Journal of endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 291–298, 1993.
- MILVAE, R. A; HINCKLEY, S. T.; CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p. 1327–1349, 1996.
- MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F2 $\alpha$  in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 2000.
- MIYAMOTO, A. et al. Multiple effects of neuropeptide Y, substance P and vasoactive intestinal polypeptide on progesterone and oxytocin release from bovine corpus luteum in vitro. **Journal of endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 451–458, 1993.
- MUSAH, A. I.; SCHWABE, C.; ANDERSON, L. L. Relaxin, oxytocin, and prostaglandin effects on progesterone secretion from bovine luteal cells during different stages of gestation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 195, n. 2, p. 255–260, 1990.
- NDIAYE, K. et al. Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors. **Journal of reproductive immunology**, v. 95, n. 1, p. 15–26, 2012.
- NISWENDER, G. D. et al. Blood flow: a mediator of ovarian function. **Biology of reproduction**, v. 14, n. 1, p. 64–81, 1976.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000a.
- NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, jan. 2000b.
- O'GRADY, J. P. et al. Inhibition of progesterone synthesis in vitro by prostaglandin F2 $\alpha$ . **Journal of reproduction and fertility**, v. 30, n. 1, p. 153–156, 1972.
- OKUDA, K. et al. Progesterone Stimulation by Prostaglandin F 2  $\alpha$  Involves the Protein Kinase C Pathway in Cultured Bovine Luteal Cells. v. 44, n. 1, 1998a.
- OKUDA, K. et al. Progesterone Stimulation by Prostaglandin F2. ALPHA. Involves the Protein Kinase C Pathway in Cultured Bovine Luteal Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 44, n. 1, p. 79–84, 1998b.
- OKUDA, K. Progesterone Is a Suppressor of Apoptosis in Bovine Luteal Cells. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 2065–2071, 2004.
- PATE, J. L. Isolation and culture of fully differentiated bovine luteal cells. **Methods Toxicol**, v. 3, p. 358–370, 1993.
- PATE, J. L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p. 1381–1397, 1996.
- PATE, J. L. et al. The interface of the immune and reproductive systems in the ovary: lessons learned from the corpus luteum of domestic animal models. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 4, p. 275–286, 2010.

- PATE, J. L.; CONDON, A. Effects of serum and lipoproteins on. v. 28, p. 551–562, 1982a.
- PATE, J. L.; CONDON, W. A. Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 28, n. 3, p. 551–562, 1982b.
- PATE, J. L.; CONDON, W. A. Regulation of steroidogenesis and cholesterol synthesis by prostaglandin F-2 $\alpha$  and lipoproteins in bovine luteal cells. **Journal of reproduction and fertility**, v. 87, n. 2, p. 439–446, 1989.
- PATE, J. L.; KEYES, P. L. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 665–676, 2001.
- PATE, J. L.; NEPHEW, K. P. Effects of in vivo and in vitro administration of prostaglandin F2 alpha on lipoprotein utilization in cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 38, n. 3, p. 568–576, 1988.
- PETROFF, M. G.; PETROFF, B. K.; PATE, J. L. Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 121, n. 5, p. 753–60, maio 2001.
- PITZEL, L.; JARRY, H.; WUTTKE, W. Different steroidogenic response of young and aged porcine small and large luteal cells to prostaglandin F2 alpha, oxytocin and estradiol. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 101, n. 4, p. 255–261, 1992.
- PRAKASH, B. S. et al. Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. **Journal of steroid biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 623–627, 1987.
- REDMER, D. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P. Contact-Dependent Intercellular Communication of Bovine Luteal Cells in Culture\*. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 2757–2766, 1991.
- SEN, A. et al. Effects of selective protein kinase c isozymes in prostaglandin2 $\alpha$ -induced Ca<sup>2+</sup> signaling and luteinizing hormone-induced progesterone accumulation in the mid-phase bovine corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 4, p. 976–984, 2005.
- SHIBAYA, M. et al. Involvement of the cytoskeleton in oxytocin secretion by cultured bovine luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 1, p. 200–5, jan. 2005.
- SHIRASUNA, K. et al. Real-time dynamics of prostaglandin F2 $\alpha$  release from uterus and corpus luteum during spontaneous luteolysis in the cow. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 189–195, 2004.
- SKARZYNSKI, D. J. et al. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin F2-induced luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1674–1681, 2003.
- SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Sensitivity of Bovine Corpora Lutea to Prostaglandin F 2  $\alpha$  Is Dependent on. v. 1298, p. 1292–1298, 1999.
- SPEROFF, L. The effects of oral contraceptives on reproduction. **International journal of fertility**, v. 34, p. 34–39, 1988.
- TREVISOL, E. et al. Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandin

(cloprostenol sodium) in cattle. **Animal reproduction science**, v. 153, p. 8–12, 2015.

TSAL, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F<sub>2</sub>α induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1016–22, nov. 1997.

WIESAK, T.; HARDIN, R. T.; FOXCROFT, G. R. Evaluation of in vitro culture conditions to demonstrate pregnancy-dependent changes in luteal function in the pig. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 2, p. 254–261, 1994.

WILTBANK, M. C. et al. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F<sub>2</sub> α. **Biology of reproduction**, v. 42, n. 2, p. 239–245, 1990.

WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal of animal science**, v. 72, n. 7, p. 1873–1883, 1994.

WOLFENSON, D. et al. Effects of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub> α production in bovine luteal cells. **Animal Reproduction Science**, v. 32, n. 1, p. 27–40, 1993.

WRIGHT, K.; PANG, C. Y.; BEHRMAN, H. R. Luteal Membrane Binding of Prostaglandin F<sub>2</sub> α and Sensitivity of Corpora Lutea to Prostaglandin F<sub>2</sub> α-Induced Luteolysis in Pseudopregnant Rats\*. **Endocrinology**, v. 106, n. 5, p. 1333–1337, 1980.

*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 $\alpha$  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.

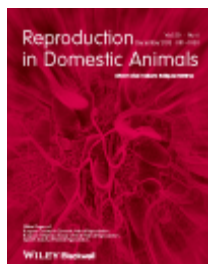
Mais estudos são necessários para compreender as interações entre a CONA e as LCs na espécie bovina, bem como o esclarecimento das ações da PGF2 $\alpha$  *in vitro*, com a utilização de ferramentas alternativas como a expressão de genes relacionados aos receptores de LH, HDL e LDL, PGF2 $\alpha$  e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



## Reproduction in Domestic Animals

---

© Blackwell Verlag GmbH



Edited By: H. Rodriguez-Martinez

Impact Factor: 1.515

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 13/55 (Agriculture Dairy & Animal Science); 24/30 (Reproductive Biology); 30/133 (Veterinary Sciences)

Online ISSN: 1439-0531

### **Author Guidelines**

#### **1. General**

*Reproduction in Domestic Animals* is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. Reproduction is considered in a broad context, with its strong disciplinary, comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. *Reproduction in Domestic Animals* is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (AERA).

We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Note that *Reproduction in Domestic Animals* only publishes well-written papers of high scientific quality and significance for the advancement of the field of reproduction, despite they being scientifically sound or properly executed or written. Feature articles or reviews should overview known information or tackle controversial issues in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal, with the aim of founding future innovative research. Letters to the Editor, viewpoint articles and comments on published papers are also welcomed. Comments should be confined to the substance of the

paper and the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. The journal publishes ONLINE-only preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers are subjected to a thorough peer-review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. Short Communications are available online only under its respective volume and issue at [www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda). The quality of articles and the standards for publication remain the same whether papers are published both print and online, or online-only.

The publication language is English.

**English Language Editing Service:** Ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. [Visit our site](#) to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

## **2. Manuscript submission**

*The submission and review process of *Reproduction in Domestic Animals* is solely handled online at <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>. To submit an article to *Reproduction in Domestic Animals*, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>, create an account and submit your article. Complete instructions on how to submit a paper are available online at the Journal website [wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda). Please note that it is compulsory to include include all authors with their affiliation and valid email addresses.*

***Please see that the corresponding author's complete address and a valid email are also present in the manuscript.***

### *2.1. Licence to publish*

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below

CTA Terms and Conditions <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html>

### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreement (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

## Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html> and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Australian Science Fund (FSF) ] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### 2.2. Authorship and Acknowledgements

**Authorship:** Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

*Reproduction in Domestic Animals* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Upon submission of the manuscript, it is required that all authors be accredited as appropriate. During the online submission process, the corresponding author will be asked to submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. **Upon submission of a manuscript all co-authors must also be registered with correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are missing or incorrect, the manuscript shall not be processed pending contact with the corresponding author.**

**Acknowledgements:** Authors **must** acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research presented. Authors **must** acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials), describing if and how this assistance was funded and included with other funding information. The acknowledgements should be brief and not include thanks to anonymous referees and editors. Where scientists are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

**Conflict of interest:** A subheading "Conflict of interest statement" **must** be placed at the end of the manuscript text (following acknowledgements), where all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately bias or influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, or direct or indirect funding.

**Funding sources:** All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this clearly.

**Use of non-commercially available instrumentation, substances , antibodies or assays:** When these had been kindly provided by any research group or company, an appropriate letter from them **MUST** be provided alongside the manuscript at submission (upload it as a well identified supplementary file).

## 3. Manuscript Requirements

### 3.1. Format

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing *throughout* and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word), .doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

### 3.2. *Length*

Original papers and review articles, including figures, tables and references, should not exceed 5,000 words. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 1,800 words, including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum. Extended data sets can be published online as supplementary material and should be identified as such.

### 3.3. *Units, abbreviations and nomenclature*

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a **registered** trademark should be marked with ®. When **non-commercially available** substances or reagents are used, the following text must be provided: "[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]"

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

### 3.4. Illustrations and tables

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the RGB mode. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour print charges are explained on the [Colour Work Agreement Form](#). Once completed, please return the form to:

Customer Services (OPI)  
 John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre  
 New Era Estate  
 Oldlands Way  
 Bognor Regis  
 West Sussex  
 PO22 9NQ

Scanned or faxed copies will not be accepted. Please direct queries to the Production Editor  
[atrda@wiley.com](mailto:atrda@wiley.com).

Tables should be created using the table function.

### *3.5. References*

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in 1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name and all the authors should be listed.

The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication.

Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumonie der Stewing. Berl Münch Tierärztl Wschr **102**, 6-11.

Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J Vet Med A **35**, 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

### *3.6. Laboratory animals*

Papers reporting work with animals should include a reference to the code of practice adopted for the experimentation. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

#### 4. Proof correction and offprints

When you receive proofs of your article, please check, correct, and return them **electronically** to the Editor-in-Chief without delay (within 3 days of receipt), as **e-annotated proofs**. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

*Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. To view, print and annotate the proofs of your article you will need Adobe Reader version 7 (or higher). This software can be downloaded (free of charge) for a whole series of platforms that include PC, Mac, and UNIX and can be downloaded from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. Further instructions will be sent with the proof. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.*

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

#### 5. Book reviews

Book reviews appear irregularly at the end of the journals. Books submitted for review are sent by the editors to a scientist involved in the special research area. No fee is paid for reviews, but the review copy of the book (either as hard copy or electronic copy) remains the property of the reviewer. Each review should begin with exact bibliographical data on the publication, according to the following pattern:

Author(s) and/or editor(s), publication title, subtitle, edition, title of the publication series (and possibly its editors) in which the book has appeared, publisher, place of publication, year of publication, number of pages, number of illustrations, tables, and diagrams, cover material (e.g. paperback, quarter cloth binding etc.), retail price. Example:

Immelmann, F.: Introduction to Animal Behaviour. Revised and extended 3rd edition. Pareys Studentexte No. 13. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1983. 223 pp., 106 figs., Balacron paperback, Euro 28.0.

#### 6. Supplements

As the official organ of the ESDAR, the EVSSAR and AERA, the journal publishes the proceedings (fully refereed main papers and abstracts) of the societies' Annual Meetings. Other Proceedings, as hard copy and/or online, can be published as Supplements following agreement with the Editor-in-Chief (for contents and scope) and the publisher (for terms and cost).

**Wiley Blackwell's Author Services** enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

*Reproduction in Domestic Animals* is covered by Wiley Online Library's **Early View** online service. **Early View** articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed

issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. **Early View** articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of **Early View** articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so **Early View** articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Last update: May 2013

## Veterinária e Zootecnia

### Diretrizes para Autores

- **Artigos Científicos**

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

**1. Página de rosto, com:**

Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;

Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

**2. Página com resumo, abstract e resumen**

Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

**3. A estrutura do artigo deverá conter:**

**Introdução:** Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

**Material e Métodos:** Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

**Resultados:** Apresentação dos resultados obtidos, que

devem ser descritos sem interpretações e comparações.

Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

**Discussão:** Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

**Conclusões:** É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

**Referências:** Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

## Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, com numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página.
3. URLs para as referências foram informadas quando necessário.
4. O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento, como anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.
6. A identificação de autoria do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, conforme instruções disponíveis em Assegurando a Avaliação Cega por Pares. O nome dos autores e suas filiações estão devidamente preenchidos em "metadados".

## Declaração de Direito Autoral

Pelo presente instrumento, concedemos os direitos autorais referente ao trabalho submetido para a possível publicação na Revista "Veterinária e Zootecnia", da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Botucatu - SP.

By agreeing with the terms presented here, the authors grant the rights regarding the submitted article for possible publication in the journal "Veterinária e Zootecnia", property of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP-Botucatu, SP.

## Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ISSN: 2178-3764