

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Estabelecimento da cultura primária de células da granulosa humanas

Paloma Lira de Oliveira Chagas

Rio de Janeiro

2019

PALOMA LIRA DE OLIVEIRA CHAGAS

Estabelecimento da cultura primária de células da granulosa humanas

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional de Formação Para Pesquisa Biomédica da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do título de mestre em Pesquisa Biomédica

Orientadora: Dra. Flavia Fonseca Bloise

Co-orientadora: Me. Ana Cristina Allemann Mancebo

Rio de Janeiro

2019

Ficha Catalográfica

Chagas, Paloma Lira de Oliveira.

Estabelecimento da cultura primária de células da granulosa humanas. / Paloma Lira de Oliveira Chagas. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2019.

47 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Flavia Fonseca Bloise.

Coorientadora: Ana Cristina Allemand Mancebo

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, / CCS, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Mestrado Profissional de Formação Para Pesquisa Biomédica, 2019.

Referências: f.40-46.

1. Cultura Primária de Células. 2. Células da Granulosa- fisiologia. 3. Separação Celular- métodos. 4. Técnicas In Vitro. 5. Seres Humanos. 6. Formação para a Pesquisa Biomédica - tese. I. Bloise, Flavia Fonseca. II. Mancebo, Ana Cristina Allemand. III. UFRJ, CCS, IBCCF, Programa de Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica. IV. Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente e sempre a Deus Pai amado de infinita bondade e amor, por todas as oportunidades e graças a mim concedidas. Sem Sua ajuda este trabalho não teria sido realizado.

Agradeço a meus guias e mentores espirituais que trabalharam comigo dia após dia, dando-me forças e incentivo na caminhada e não permitindo que eu desistisse apesar das dificuldades.

Agradeço à minha mãe Maria de Lourdes, à minha avó Tiana e às minhas crianças Geovana, Sophia e Maria Laura. Cada intenção de crescimento é para vocês!

Agradeço ao Ser iluminado colocado na minha vida na forma de orientadora. Um presente recebido. Dra Flavia Fonseca Bloise, palavras não são suficientes para expressar o sentimento de gratidão por toda paciência e dedicação.

Gratidão à Dra Maria do Carmo Borges de Souza pelas portas abertas e pelas oportunidades tão valiosas dadas a mim.

Agradeço ao Dr. Marcelo Marinho de Souza por ser um oásis de calma no meio do turbilhão do dia a dia. Gratidão pelas oportunidades!

Gratidão ao Dr. Roberto de Azevedo Antunes, que através da sua intensidade nos ensina a nunca desistir até alcançar o êxito. Gratidão pela confiança!

Gratidão à professora Dra Tânia Ortiga por ter aberto as portas do laboratório para mim e me recebido de braços abertos.

Gratidão à Ana Cristina Barros da Cunha. Outro ser iluminado enviado para minha vida. Sem você, definitivamente, nada teria acontecido. Inclusive este trabalho.

Gratidão à Luiza Borges e Diana Bastos. Se não fosse por vocês, esse projeto não teria saído do lugar.

Gratidão à Elvira Vervloet e Carlos Alberto Pereira que não medem esforços para me ajudarem a realizar meu sonho.

Gratidão à minha mãe Greice Milhar por ter me recebido de braços abertos em sua casa e por ter me dado meu presente mais precioso.

Lokah Samastah Sukhino Bhavantu

(Que todos os seres possam ser livres e felizes e que minhas palavras, ações e pensamentos contribuam para isto).

Resumo

CHAGAS, Paloma Lira de Oliveira. **Estabelecimento da cultura primária de células da granulosa humanas**. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação Para Pesquisa Biomédica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

As células da granulosa (CG) são células somáticas que, ao longo do desenvolvimento folicular, se diferenciam e estão envolvidas no desenvolvimento e maturação dos oócitos, no desenvolvimento embrionário e na manutenção da gestação através da secreção de hormônios, citocinas e metabólitos. As CG isoladas podem ser utilizadas em co-cultura de oócitos imaturos, auxiliando no desenvolvimento e maturação dos mesmos durante o tratamento de reprodução assistida. Além disto, há o uso em pesquisas biomédicas para análises de infectividade por patógenos e estudos básicos funcionais. Neste trabalho, visamos o desenvolvimento e padronização do protocolo de isolamento e cultivo de CG humanas para que seja reprodutível em clínicas de reprodução assistida. Para tal, as CG foram obtidas de pacientes em tratamento para fertilização *in vitro*. Inicialmente, o isolamento foi realizado a partir de três protocolos de isolamento elaborados em sequência. No protocolo 1 foi realizada a desagregação enzimática com tripsina das CG, no protocolo 2 foi realizada a desagregação enzimática associada ao uso de filtro de 70 µm e no protocolo 3 foi acrescentado o tampão para lise de hemácias tampão amônia-cloro-potássio (ACK). No protocolo 1, pudemos observar muitos agregados celulares dificultando avaliar a celularidade total. No protocolo 2, observamos a diminuição de agregados, contudo as hemácias ainda estavam em grande quantidade. No protocolo 3, obtivemos uma suspensão de células sem agregados e livre de hemácias. Testamos se o transporte das CG no fluido folicular apresentaria vantagem em relação ao tampão fosfato, no protocolo 4, contudo, o transporte no fluido folicular aumentou a contaminação por hemácias. Para otimizar o isolamento, desenvolvemos o protocolo 5 onde usamos hialuronidase e ACK associados e em seguida utilizamos um gradiente de Percoll para a separação de possíveis agregados celulares. Contudo, perdemos grande quantidade de células, o que nos levou ao protocolo 6 onde seguimos utilizando a hialuronidase e o ACK, diminuindo a quantidade de centrifugações. O cultivo *in vitro* das CG também foi avaliado. Para tal, as células foram cultivadas em placas de 96

poços, na densidade de $1,05 \times 10^4$ células/cm², nos meios de cultivo CSCM-C ou DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo (HS) ou 2% de soro sintético (SS). O número de células diminuiu em todas as condições realizadas no período de 24 horas, não observamos redução adicional no período de 48 horas. Contudo, foi possível observar que as CG com morfologia mais favorável estavam nos meios CSCM-C e DMEM com 2% de HS. Observamos que o número de células após 24 horas em cultura foi semelhante entre as CG cultivadas em meio CSCM-C e DMEM com 2 % de HS. Nossos dados, sugerem o uso do protocolo 6 para isolamento das CG e o cultivo *in vitro* com CSCM-C ou DMEM com 2 % de HS para a prática clínica ou em laboratórios de pesquisa, respectivamente.

Palavras chaves: cultura primária de células, células da granulosa - fisiologia, separação celular - métodos, técnicas *in vitro*, seres humanos.

Abstract

CHAGAS, Paloma Lira de Oliveira. **Estabelecimento da cultura primária de células da granulosa humanas**. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação Para Pesquisa Biomédica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Granulosa cells (GC) are somatic cells that, during follicular development, differentiate and are involved in the development and maturation of oocytes, in the embryonic development, and in the maintenance of gestation through the secretion of hormones, cytokines and metabolites. GC culture may be a new therapeutic approach in *in vitro* fertilization. The isolated GCs can be used in co-cultures of immature oocytes, aiding the development and maturation thereof during the assisted reproduction treatment. In addition, there is the use in biomedical research for analysis of infectivity by pathogens and basic functional studies. Herein, we aimed the development and standardization of the human GC isolation and culture protocol, to be reproducible in assisted reproduction clinics. For this, GC were obtained from patients being treated for *in vitro* fertilization. Initially, the isolation was performed from three isolation protocols elaborated in sequence. In protocol 1 GC were enzymatic separated using trypsin; in protocol 2 the enzymatic separation were associated with the use of 70 μm filter and protocol 3 was added to the red blood cell lysis buffer (ACK). In protocol 1, we could observe many cellular aggregates making it difficult to analyze cellularity. In protocol 2, we observed a decrease in aggregates, but the red cells were still in significant quantity. In protocol 3, we obtained a suspension of cells without aggregates and free of red blood cells. We tested whether GC transport in follicular fluid would have an advantage over phosphate buffer, in protocol 4, however, transport in follicular fluid increased the red blood cell contamination. In order to optimize the isolation, we developed protocol 5 where we used hyaluronidase and ACK and then used a Percoll gradient to separate possible cellular aggregates. Though, we lost a large number of cells, which led us to protocol 6 where we continued using hyaluronidase and ACK, reducing the number of centrifugations. *In vitro* GC culture was also evaluated. For this, GC were plated in 96-well plates at the density of 1.05×10^4 cells/cm² in CSCM-C culture medium, or DMEM supplemented with 2 % horse serum (HS) or 2 % synthetic serum (SS). The cell number decreased in all the conditions performed in the 24-hour period, we did

not observe further reduction in the following 48h period. However, it was possible to observe that G bCs with more favorable morphology were in medium CSCM-C and DMEM 2 % HS. We observed that the number of cells in 24h culture was similar between CGs cultured on CSCM-C medium and DMEM 2 % HS. Our data suggest the use of protocol 6 for isolation and culture with CSCM-C or DMEM 2% horse serum for clinical practice or in research laboratories, respectively.

Key words: primary cells culture, granulosa cells, cell separation, in vitro techniques, humans

Lista de abreviaturas

ACK: Tampão amônia-cloro-potássio

CG: Células da granulosa

CSCM-C: Meio de cultura único contínuo – completo, do inglês *Continuous Single Culture Medium-Complete*

DMEN: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FF: Fluido folicular

FSH: Hormônio Folículo-estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina, do inglês *Gonadotropin-Releasing Hormone*

GCH: Gonadotrofina coriônica humana

HS: Soro de cavalo

LET: Laboratório de endocrinologia translacional

LH: Hormônio luteinizante

PBS: Solução salina tamponada por fosfato do inglês *Phosphate Buffered Saline*

SS: Soro sintético

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Lista de figuras

Figura 1: Esquema dos componentes celulares formadores do folículo ovariano.

Figura 2: Apresentação dos estágios foliculares ao longo do ciclo menstrual.

Figura 3: Representação do desenvolvimento folicular ao longo da foliculogênese.

Figura 4: Imagem representativa da captação de oócitos por aspiração folicular guiada por ultrassom.

Figura 5: Esquema representativo da lavagem das CG em PBS.

Figura 6: Esquema representativo do protocolo de isolamento 1.

Figura 7: Esquema representativo do protocolo de isolamento 2.

Figura 8: Esquema representativo do protocolo de isolamento 3.

Figura 9: Esquema representativo do protocolo de isolamento 4.

Figura 10: Imagem representativa do experimento comparativo entre tripsina e hialuronidase.

Figura 11: Esquema representativo do protocolo de isolamento 5.

Figura 12: Esquema representativo do protocolo de isolamento 6.

Figura 13: Imagem representativa do hemocitômetro e cálculo para concentração de células.

Figura 14: Fotomicrografia das CG isoladas com o protocolo 1.

Figura 15: Fotomicrografia das CG isoladas com o protocolo 2.

Figura 16: Fotomicrografia das CG isoladas com o protocolo 3.

Figura 17: Imagem das CG isoladas utilizando os diferentes meios de cultivo, no período de 24 e 48h.

Figura 18: Gráfico do curso temporal do cultivo no período de 24 h e 48 h.

Figura 19: Fotomicrografia das CG isoladas com o protocolo 4.

Figura 20: Gráfico do número de células obtidas transportadas no PBS e no FF.

Figura 21: Gráfico comparativo do tempo necessário para a realização dos protocolos 1 ao 6.

Figura 22: Fotomicrografia das CG isoladas no protocolo 6.

Figura 23: Gráfico comparativo da quantidade de células obtidas em cada protocolo.

Lista de Quadros e tabelas

Quadro 1: Quadro que exhibe a composição dos meios de cultura utilizados.

Tabela 1: Comparativo dos protocolos descritos na literatura.

Tabela 2: Perfil das pacientes participantes do trabalho.

Tabela 3: Tabela contendo os resultados obtidos com o protocolo de isolamento 5.

Tabela 4: Tabela contendo um levantamento dos valores dos itens utilizados em cada protocolo de isolamento para cada caso realizado.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. O ciclo ovariano	3
2. Justificativa	7
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivo específico	11
4. Material e métodos	12
4.1. Perfil das pacientes	12
4.2. Estimulação ovariana	12
4.3. Obtenção das células da granulosa.....	13
4.3.1. Protocolo de isolamento 1.....	14
4.3.2. Protocolo de isolamento 2.....	15
4.3.3. Protocolo de isolamento 3.....	16
4.3.4. Protocolo de isolamento 4.....	17
4.3.5. Protocolo de isolamento 5.....	18
4.3.6. Protocolo de isolamento 6.....	20
4.4. Quantificação celular utilizando o hemocitômetro	21
4.5. Padronização do meio de cultura utilizado	22
4.6. Estatística	24
5. Resultados	26
5.1. Perfil das pacientes	26
5.2. Resultados do protocolo de isolamento 1	26
5.3. Resultados do protocolo de isolamento 2	27
5.4. Resultados do protocolo de isolamento 3	27
5.5. Comparação dos diferentes meios de cultivo	28
5.6. Resultados do protocolo de isolamento 4	30
5.7. Resultados do protocolo de isolamento 5	32
5.8. Resultados do protocolo de isolamento 6	32
5.9. Levantamento do custo de cada protocolo por caso	34
6. Discussão	35
7. Perspectivas	39
8. Referências	40

1. Introdução

Os ovários são órgãos que possuem funções endócrina e reprodutora. Estes tecidos sintetizam e secretam os hormônios esteroides sexuais, além da produção e liberação de gametas (GUERREIRO et al., 2015). Anatomicamente os ovários são divididos em córtex e medula, esta última composta por tecido conjuntivo e células intersticiais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O córtex possui diversos folículos primordiais cercados por células do estroma, chamadas células foliculares ou células da granulosa (CG) (BABINSKI, 2012). Funcionalmente os ovários podem ser divididos em três compartimentos: folicular, corpo lúteo e estroma. O primeiro com função primordial de secreção de estrogênios, o segundo produzindo e secretando progesterona, e o terceiro produzindo estrogênios e androgênios (MACHADO, 2004).

Os folículos são as unidades funcionais dos ovários e são formados por célula germinativa, ou oócito, e células somáticas que mantêm um microambiente favorável, gerando e enviando estímulos para seu crescimento e maturação oocitária (ASSIDI et al., 2008; FENG et al., 2017). O ambiente folicular é composto de três tipos de células somáticas: células da teca, CG e células do *cumulus oophorus*.

As células da teca têm origem do interstício e formam a camada externa do folículo. Essas proporcionam integridade e fornecem androgênios como substrato para as células da granulosa converterem em estrogênios (HONDA et al., 2007; ROSSETTO et al., 2011).

As CG realizam muitas funções associadas ao oócito, desenvolvimento embrionário e manutenção da gravidez (KRANC et al., 2017). As CG proliferam ao longo do desenvolvimento folicular e sustentam o desenvolvimento oocitário através da secreção de citocinas e metabólitos que serão utilizados para a produção de ATP pelas mitocôndrias oocitárias (IWATA, 2017). São observadas como a primeira população de células a entrarem em apoptose nos folículos atrésicos, sugestivo de serem as iniciadoras da atresia folicular (SINDEREWICZ et al., 2017).

O complexo *cumulus oophorus* é composto por camadas de CG intimamente relacionadas ao oócito. São fundamentais no crescimento, desenvolvimento, maturação do oócito dentro do folículo (GOTTARDI et al., 2012), já que fornecem íons, aminoácidos e metabólitos (CROCOMO et al., 2012). A interação entre o

complexo *cumulus* e o oócito é objeto de muitos estudos, visto que essa comunicação intercelular pode estar relacionada com a capacitação oocitária e a qualidade embrionária. Esta capacitação do oócito é influenciada pela segregação cromossômica durante o pico do hormônio luteinizante (LH) induzindo-o a retomar seu processo de meiose (CAMPOS et al., 2011; CHEN et al., 2016; FRAGOULI et al., 2012; JIAJIE et al., 2017; KORDUS; LAVOIE, 2017).

O microambiente folicular é composto pelas células da teca, da granulosa, células do *cumulus oophorus* (Figura 1), pelo fluido folicular (FF) e pela lâmina basal. Há uma vasta rede vascular ao redor do folículo crescente, contudo os vasos não penetram o folículo. Assim, todos os componentes que entram em contato com o oócito e atravessam a barreira de CG, vão formar o filtrado plasmático. Este último com as secreções das CG formam o FF. O FF envolve o oócito e faz a comunicação entre os diferentes tipos celulares contidos no folículo. Contém proteínas, açúcares, hormônios, fatores de crescimento e eletrólitos fundamentais para o desenvolvimento folicular (ANDRADE, 2013; FREITAS et al., 2017).

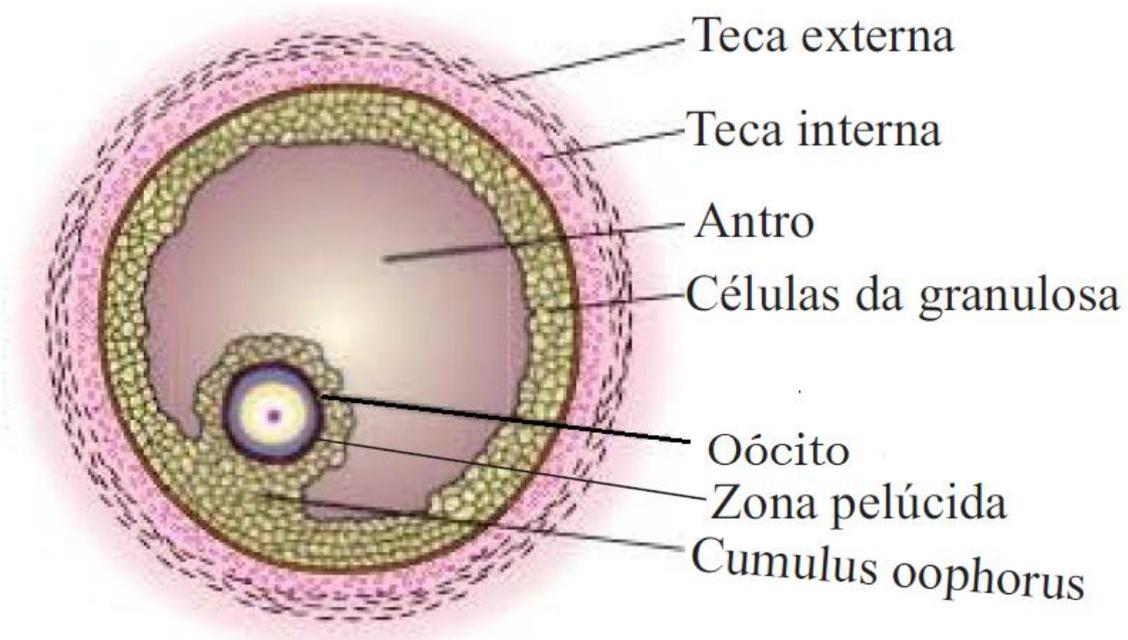


Figura 1 – Figura apresenta um esquema dos componentes celulares formadores do folículo ovariano, onde mostra as diferentes camadas celulares e suas localizações. (Modificado de <http://embriologiveterinariauem.blogspot.com/>. Acessado em 12/12/2018)

1.1. O ciclo ovariano

O ciclo ovariano é caracterizado por variações hormonais levando a liberação do gameta e preparação do endométrio para futura implantação embrionária. Este é compreendido por três fases distintas: fase folicular, fase ovulatória e fase lútea, com duração de aproximadamente 28 dias (GUYTON; HALL, 2011).

Na fase folicular inicial do ciclo ovariano, ocorre a descamação do endométrio, que se desprende e é eliminado na forma de menstruação, marcando o primeiro dia do ciclo. Neste momento estão baixos os níveis de estradiol e progesterona (ARAÚJO et al., 2015). Na fase folicular as CG formam uma camada única de células ao redor do oócito. Sofrem influência do hormônio folículo estimulante (FSH) e proliferam, formando outras camadas. O FSH é uma glicoproteína produzida pela adeno-hipófise que age sobre os ovários estimulando crescimento e maturação oocitária. O FSH age também nas CG estimulando a conversão de androgênios em estrogênio (AIRES, 2008; XIE et al., 2017). Ao progredir para a fase proliferativa, as CG estimuladas pelo FSH secretam progesterona, estradiol, aminoácidos e lipídios, formando o FF que acumulado forma o antro (BASUINO; SILVEIRA, 2016). O antro é uma cavidade que separa as células foliculares e é preenchido pelo FF (NAVAKANITWORAKUL et al., 2016).

Além do FSH, a adeno-hipófise secreta o LH, uma glicoproteína responsável pelo crescimento, maturação e rotura folicular para a liberação do oócito. O LH age sobre os receptores nas células da teca estimulando a produção de androgênios, que serão convertidos em estrogênios pelas CG (LIMA; BARACAT, 1995).

A fase ovulatória dura em média três dias e resulta na liberação do óvulo. Nela há o aumento dos níveis de progesterona, já os níveis de FSH e LH decaem (ARRUDA; SILVA, 2008). Ao final da fase ovulatória, a membrana do folículo se rompe. Sendo assim, o oócito é liberado e a cavidade do folículo é preenchida com sangue e linfa, resultando na estrutura chamada corpo lúteo (MARTIN; FERREIRA, 2009).

A fase lútea é caracterizada pelo aumento do LH sérico. Este hormônio irá estimular a diferenciação das CG, processo chamado de luteinização. As CG luteinizadas aumentam de tamanho e ficam repletas de lipídios (GUYTON; HALL, 2011). Estas originam as grandes células luteais, que contribuem para a formação do corpo lúteo maduro, tem a capacidade de produzir grande quantidade de progesterona, mas não são mais responsivas à estimulação do LH (BERTAN; BINELLI; MADUREIRA, 2006; MARTIN; FERREIRA, 2009). A progesterona produzida pelo corpo lúteo estimula o espessamento endometrial. Se houver a fertilização e clivagem do embrião até o estágio de blastocisto, poderá ocorrer a implantação e futura gestação. Caso não haja a fertilização, o corpo lúteo se degenera, levando à diminuição dos níveis de estradiol e progesterona, causando uma diminuição do fornecimento de sangue para o endométrio. Com isso, há a descamação das paredes internas do útero sendo eliminadas na forma de menstruação (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016) (Figura 2).

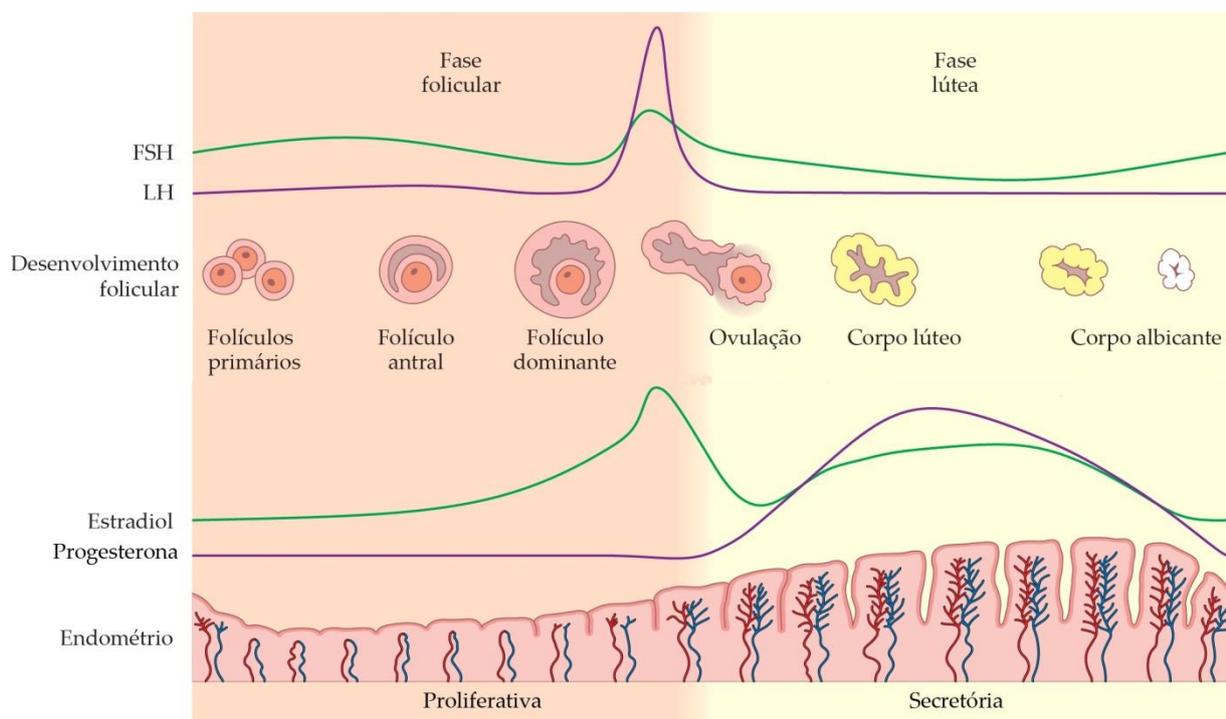


Figura 2 -Apresentação dos diferentes estágios foliculares ao longo do ciclo menstrual, assim como as variações hormonais e endometriais. (Modificado de http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4456/menstruacao_normal_e_anormal.htm. Acessado em 13/02/2018)

A foliculogênese se inicia antes do nascimento da mulher, quando uma população de células somáticas se diferencia em células primordiais germinativas (ROJAS et al., 2015). É um processo onde folículos primordiais são recrutados e nela ocorre o desenvolvimento e capacitação do oócito para a ovulação e futura fecundação. Este processo ocorre paralelamente à oogênese, caracterizado pela proliferação das CG e pelo crescimento do oócito (CONTO, 2013; LIMA et al., 2016).

Folículos primários são os folículos primordiais ativados, revestidos por uma camada de epitélio cúbico simples de CG (SERAKIDES et al., 2001). Já os folículos secundários são aqueles que possuem duas ou mais camadas de CG. A camada glicoproteica forma o espessamento da zona pelúcida tornando-a visível da camada de células da teca (ROSSETTO et al., 2011). Na penúltima fase, a fase pré-ovulatória, o folículo possui camadas de células murais da granulosa, que ficam ao redor do folículo, e células do *cumulus oophorus*, localizadas em volta do oócito, juntamente com camadas de células da teca e um grande antro preenchido por FF (VILELA, 2016) (Figura 3).

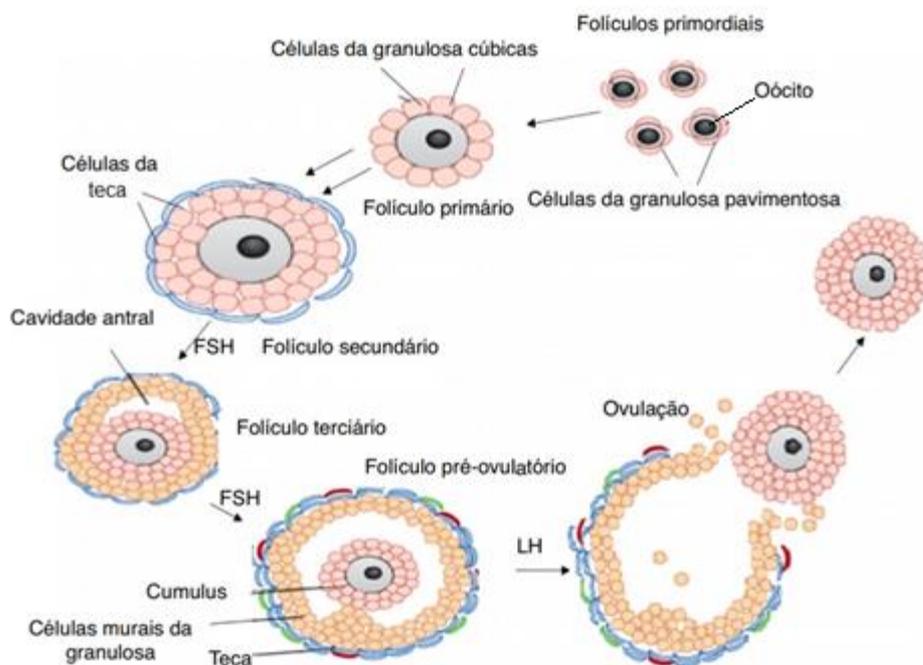


Figura 3—Representação do desenvolvimento folicular ao longo da foliculogênese. Imagem mostra as diferentes modificações que o folículo vai sofrendo durante seu desenvolvimento e em quais fases os diferentes hormônios vão agindo (Modificado de GUERREIRO et al., 2015).

A maturação oocitária compreende a maturação nuclear e citoplasmática do oócito, que precisam ocorrer sincronicamente para que não haja dano celular. A maturação nuclear do gameta ocorre devido à ação do LH nas células de teca, que liberam androgênios que as CG converterão em estrogênios o que promove no oócito a: separação dos cromossomos, liberação do primeiro glóbulo polar e formação do segundo fuso meiótico. Já a maturação citoplasmática engloba a reorganização das organelas e acúmulo de RNA e proteínas, o que favorece a maturação nuclear do oócito (SANCHES, 2016).

2. Justificativa

As CG são indispensáveis para a competência oocitária, ajudando em sua maturação nuclear progredindo para metáfase II, no sucesso de sua fertilização e contribuindo com o desenvolvimento embrionário desde a fecundação até a chegada à fase de blastocisto (ASSIDI et al., 2008; EPPIG, 2001; GOTTARDI; MINGOTI, 2009). As CG também são responsáveis pela produção do hormônio anti-mülleriano, importante na diferenciação do embrião do sexo masculino (GASPARIN et al., 2015)(GASPARIN et al., 2015). Estudar as CG é importante para melhor compreender a sua função na regulação da maturação do oócito (HATZIRODOS et al., 2017).

As CG podem ser obtidas através da punção ovariana para captação de oócitos em pacientes submetidas a tratamento de fertilização *in vitro*. Após a captação, as CG são removidas dos oócitos para classificação de maturação destes, facilitando a injeção de espermatozoides e também tornando-as disponíveis para pesquisa (WINTERHAGER; KIDDER, 2015). A identificação dos oócitos pode ser baseada na avaliação da quantidade de camadas de CG, no número destas, no grau de compactação e no aspecto do citoplasma das CG (OTERO; COSTA; PEREIRA, 2017). A redução do número de CG leva à redução do nível de estrogênio e progesterona, uma vez que estão envolvidas na conversão de androgênios em estrogênios e na produção de progesterona (WEI et al., 2016).

Por compartilharem o mesmo ambiente com o oócito, as CG podem fornecer informações sobre o estado deste. Ademais, as CG podem ser utilizadas como teste de verificação de competência oocitária pela grande quantidade disponível durante as técnicas de fertilização *in vitro* (FRAGOULI; LALIOTI; WELLS, 2014). XU et al. (2014) demonstram que é possível prever o grau de maturação e o potencial de fertilização oocitária e de desenvolvimento de bons embriões através da análise de perfis gênicos e moleculares das CG. Na reprodução *in vitro*, as baixas taxas de formação de blastocisto e de gestações a termo podem estar relacionadas com a retirada dos oócitos do ambiente folicular e com isso, resultando na perda da interação hormonal e molecular com as células foliculares, levando a uma diminuição na qualidade e capacidade oocitária (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

A cultura de CG pode ser uma nova perspectiva terapêutica para casais inférteis, pois isoladas podem ser utilizadas em co-cultivos de oócitos imaturos, auxiliando o desenvolvimento e maturação dos mesmos durante o tratamento de reprodução assistida (CAMPOS et al., 2011; GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008; JAHROMI et al., 2015; VIRANT-KLUN et al., 2018). Além disto, podem ser utilizadas como objeto de pesquisas biomédicas para análises de infectividade por patógenos (WANG et al., 2016).

Portanto, a padronização do isolamento e do cultivo das CG se fazem necessários. Há uma vasta gama de protocolos de isolamento e cultivos utilizados na literatura. Contudo, os mesmos são muito diferentes entre si e muitos utilizam técnicas que não podem ser reproduzidas em clínicas de fertilização *in vitro*. Alguns protocolos utilizam células de pacientes submetidas a tratamento de reprodução assistida, contudo a maioria consiste no uso de células provenientes da reprodução animal. Em alguns protocolos as células são obtidas de ovários de cobaias ou de animais provenientes de abatedouros (NAKAMURAS; SUGINOS; TITANISQ, 1991; PAKSY et al., 2001; PORTELA; ZAMBERLAM; PRICE, 2010; VIREQUE et al., 2013; BELANI et al., 2016; DENTIS et al., 2017; PEREGO et al., 2017; SUN et al., 2017; YADAV et al., 2018; VIRANT-KLUN et al., 2018 -Tabela 1).

Tabela 1 - Comparativo dos protocolos descritos na literatura

Espécie	Origem da célula	Prós	Contras	Referência
Rato	Ovário	Quantificação dos receptores de LH nas CG	- Não há no trabalho explicação de como as CG foram isoladas dos ovários - Experimento com animal - Utiliza o ovário inteiro do animal	NAKAMURAS; SUGINOS; TITANISQ, 1991
Humano	FF	Células aproveitadas de material que seria destinado ao descarte	- Dificuldade de encontrar o protocolo, tendo que procurar em trabalhos anteriores.	PAKSY et al., 2001
Bovino	Ovário	Células aproveitadas de material que seria destinado ao descarte	- Utiliza o ovário inteiro do animal - Protocolo de cultivo de difícil encontro	PORTELA; ZAMBERLAM; PRICE, 2010
Humano	FF	Células aproveitadas de material que seria destinado ao descarte	Uso de meio de cultura de composição indefinida devido a pedido de patente	VIREQUE et al., 2013
Humano	FF	Células aproveitadas de material que seria destinado ao descarte	Utilização de materiais derivados de animal	BELANI et al., 2016
Bovino	Ovário	Células aproveitadas de material que seria destinado ao descarte	Utiliza o ovário inteiro do animal	DENTIS et al., 2017
Bovino	Ovário	Células aproveitadas de material que seria destinado ao descarte	- Utiliza o ovário inteiro do animal - Protocolo de cultivo de difícil encontro	PEREGO et al., 2017
Rato	Ovário	Terapia celular para tratamento de insuficiência ovariana causada por quimioterapia	Utiliza o ovário inteiro do animal	SUN et al., 2017
Búfalo	Ovário	Células aproveitadas de material que seria destinado ao descarte	- Utiliza o ovário inteiro do animal - Protocolo de cultivo de difícil encontro	YADAV et al., 2018
Humano	Células aproveitadas da denudação dos oócitos	Células aproveitadas de material que seria destinado ao descarte	Técnica onde a recuperação de células é muito pequena	VIRANT-KLUN et al., 2018

Os protocolos disponíveis atualmente na literatura ou não são possíveis de serem reproduzidos em humanos ou não ter o detalhamento metodológico explicitado como descrito na tabela 1 dificulta o isolamento e utilização das CG em clínicas de reprodução assistida. Assim, o desenvolvimento de um protocolo padrão e reprodutível de isolamento de CG a partir do material biológico humano poderá contribuir para otimizar as técnicas de fertilização assistida visando o melhor desenvolvimento do embrião *in vitro*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Elaborar e padronizar uma metodologia de isolamento e cultivo primário de CG humanas obtidas do FF das pacientes submetidas às técnicas de reprodução assistida.

3.2. Objetivos específicos:

- 1) Estabelecer o transporte das CG.
- 2) Estabelecer o método de isolamento das CG que possa ser reprodutível em clínica de reprodução assistida.
- 3) Testar as condições de cultivo das CG humanas em diferentes meios de crescimento.

4. Materiais e métodos

4.1. Perfil das pacientes

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e encontra-se na plataforma Brasil (02213812.4.0000.5275).

Critério de inclusão: 37 pacientes submetidas ao procedimento de estimulação ovariana com captação de oócitos, para fertilização *in vitro* ou criopreservação de oócitos, na clínica Fertipraxis Centro de Reprodução Humana, no período de 23 de janeiro de 2017 a outubro de 2018, que apresentassem ao menos três imagens foliculares, com diâmetro maior ou igual a 18 mm na ultrassonografia no dia do desencadeamento do ciclo com o hormônio gonadotrofina coriônica humana (GCH).

4.2. Estimulação ovariana

As pacientes foram submetidas ao estímulo ovariano controlado com protocolos utilizando FSH e LH (Pergoveris[®], Merck Serono) ou FSH (Gonal[®], Merck Serono ou Fostimon[®], UCB Biopharma), associadas ao bloqueio hipofisário com uso do análogo antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Cetrotide[®], Merck Serono), que previne ovulação prematura nas pacientes, e desencadeamento do ciclo para maturação oocitária final com GCH recombinante (Ovidrel[®], Merck Serono) ou um análogo do GnRH (Gonapeptyl Daily[®], Ferring).

A coleta dos oócitos foi realizada por punção folicular guiada por ultrassonografia por via transvaginal, utilizando um aparelho Medison X8[®] e agulha de aspiração de lúmen único de 17 *gauge* (Wallace[®], Smiths Medical), em pressão negativa de 90 mmHg produzida por bomba de vácuo Single Vac Pioneer Pro-Pump (Life Global Group[®]), 36 horas após a administração do GCH ou do análogo do GnRH como está exemplificado na figura 4.

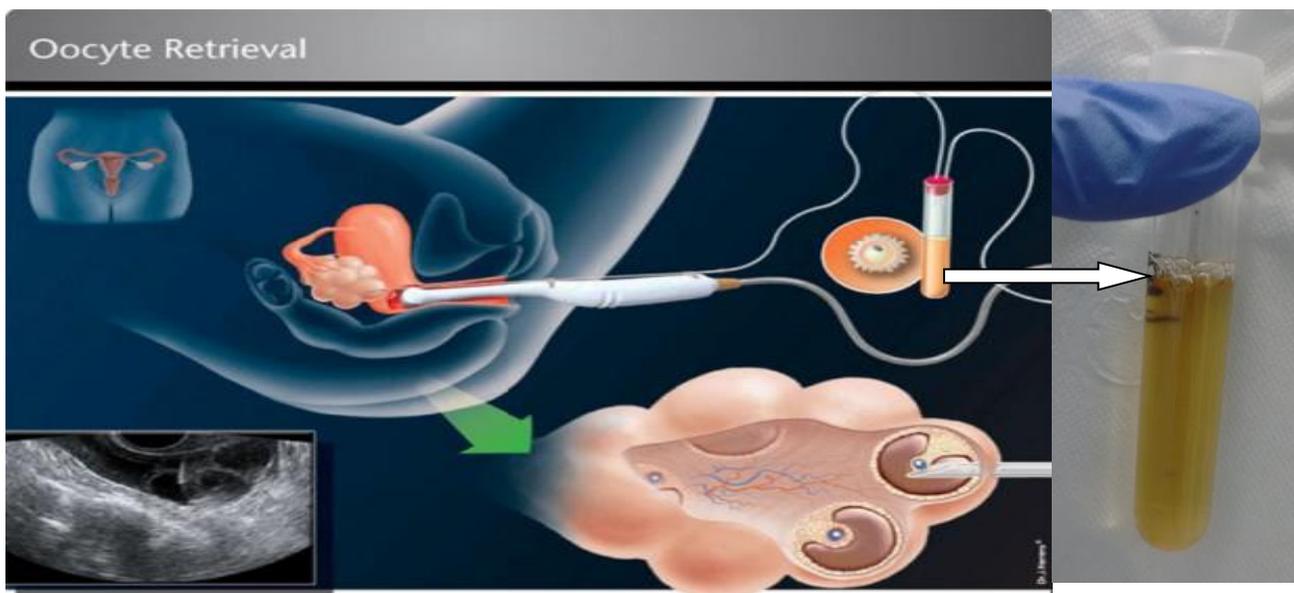


Figura 4 – Figura representativa da captação de oócitos através da aspiração folicular guiada por ultrassom por via transvaginal. Figura mostra um esquema representativo dos ovários sendo puncionados, do sistema de aspiração, assim como da visão ao ultrassom. Ao lado, vemos um tubo com o FF aspirado da paciente. (Imagem retirada de <http://www.clinicasynesis.com.br/blogr/?p=1216>. Acessado em 12/11/2018)

4.3. Obtenção das células da granulosa

Após a coleta dos oócitos, as células da granulosa foram retiradas do FF e lavadas, em uma placa de 60 mm contendo 5 mL de tampão fosfato (Tampão fosfato *Dulbeccos* - Ingámed®) (PBS) aquecido a 37°C e acondicionadas em tubo cônico contendo 5 mL de PBS (Figura 5).

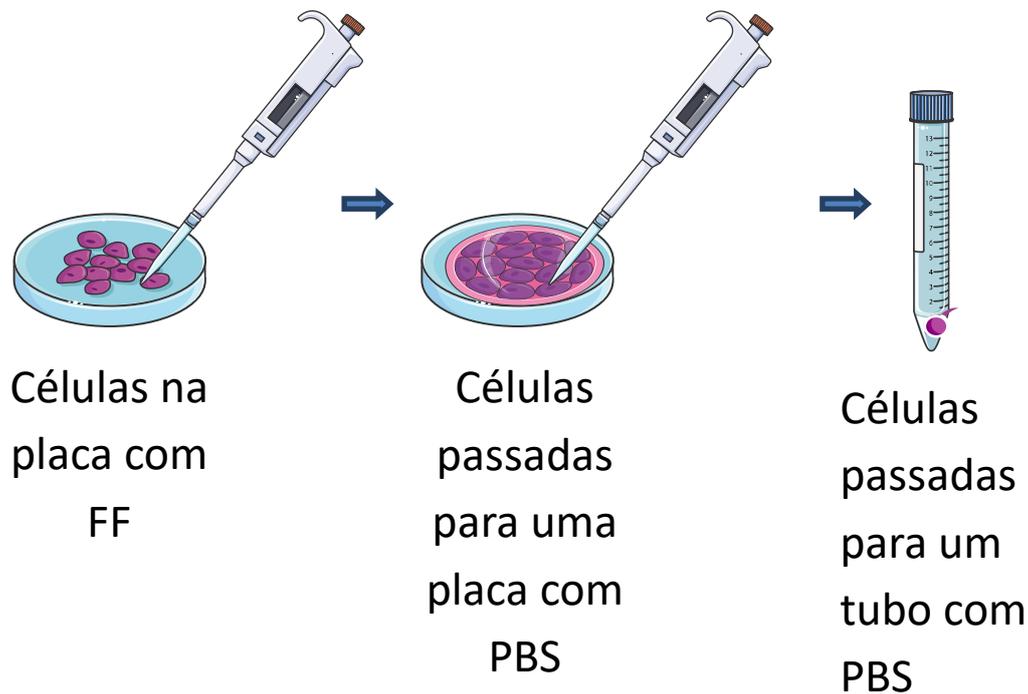


Figura 5 - Esquema representativo da lavagem das CG em PBS, onde as CG são retiradas da placa com FF com auxílio de micropipeta automática, são passadas para uma placa com PBS para a retirada de hemácias e vestígios de FF e em seguida passadas com micropipeta automática para um tubo cônico contendo PBS.

O tubo com as células da granulosa foi envolto em papel alumínio e acomodado em uma caixa de isopor, colado em uma das paredes, ao lado de uma almofada de gelo reutilizável e transportado a uma temperatura de aproximadamente 12 °C. A caixa de isopor contendo as células foi transportada para o Laboratório de Endocrinologia Translacional (LET) da UFRJ, no período de até três horas do término do preparo das células, para o início do processamento. Após a chegada ao LET, as suspensões de células seguiram para as etapas de isolamento em seis protocolos distintos descritos a seguir.

4.3.1. Protocolo 1

Após a chegada ao LET, o tubo com a suspensão de células foi centrifugado a 750 g por 5 minutos à 4 °C. Seguida a centrifugação, retiramos o sobrenadante de PBS com o auxílio de uma pipeta e incubamos as células em tripsina - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Gibco®) a 0,15% em meio DMEM *high glucose* (DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium* Gibco®), para a desagregação química das mesmas, à 37 °C sob agitação de 140 rpm durante 10 minutos. Em seguida, centrifugadas por 5 minutos a 750 g à 4 °C para a retirada da tripsina. O precipitado

com as células foi ressuspendido em 1 mL de DMEM. Dessa suspensão, separamos uma alíquota de 10 μ L em um *ependorf*, acrescentamos 10 μ L de azul de Tripán, e homogeneizamos com sucessivas pipetagens. Uma alíquota desse homogeneizado foi acondicionado no hemocitômetro, assim aferimos a concentração de células como exposto no item 4.4. (Figura 6 e anexo 1).

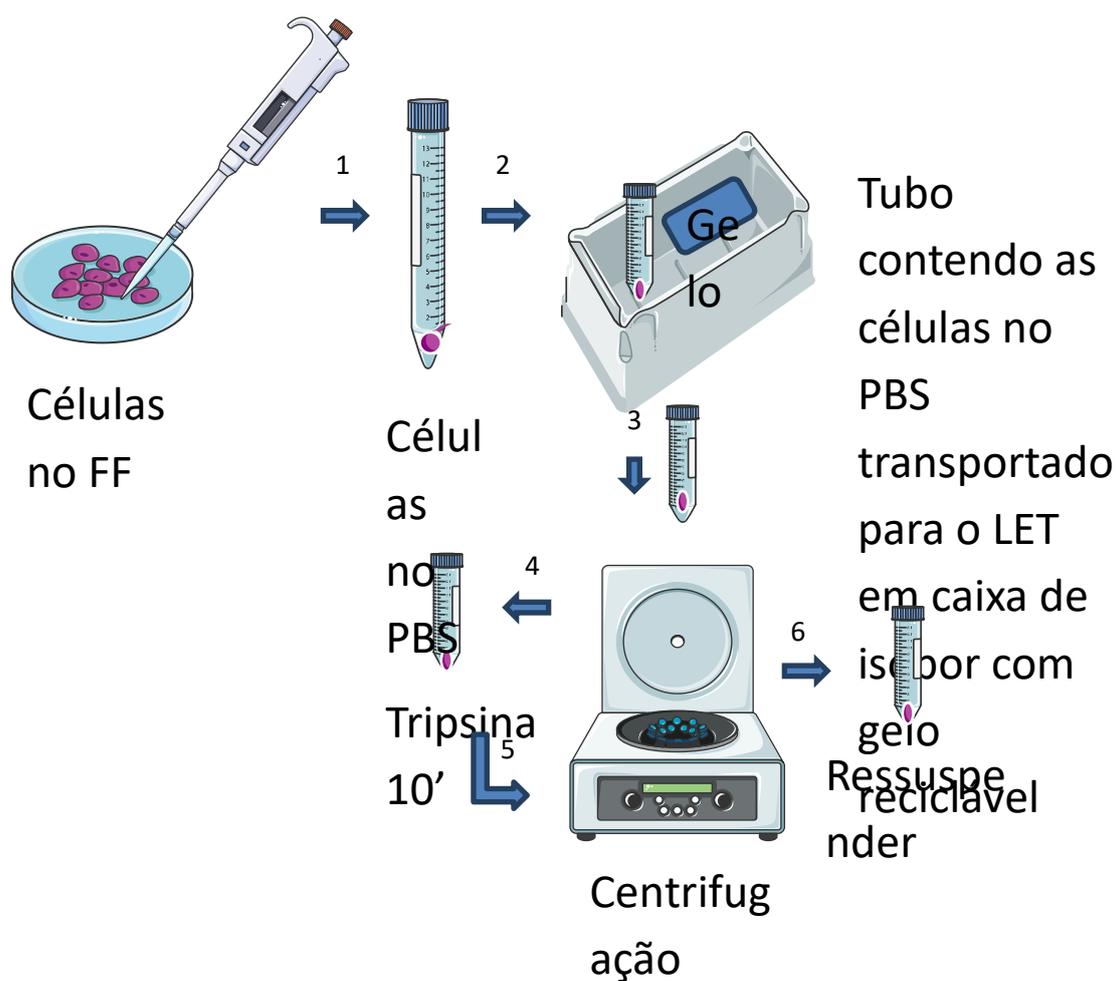


Figura 6 - Esquema representativo do protocolo de isolamento 1 onde utilizamos somente a desagregação enzimática utilizando tripsina. Números sobre as setas indicam a ordem das etapas onde as células após serem retiradas do FF e acondicionadas no tubo com PBS, foram transportadas para o LET em caixa de isopor. Após chegar ao LET, o tubo com as células foi centrifugado para retirar o PBS, o sedimento das células incubado em tripsina. Passado o tempo de incubação, o tubo é centrifugado para a retirada da tripsina e o sedimento de células é ressuspendido em meio de cultura.

4.3.2. Protocolo 2

Após a chegada ao LET e centrifugação para a retirada do PBS, como em 4.3.1, o precipitado de células foi incubado com tripsina EDTA 0,15% em banho seco à 37 °C, sob agitação de 140 rpm por 10 minutos, centrifugadas por 5 minutos em rotação de 750 g à 4 °C para a retirada da tripsina e ressuspendidas em 1 mL de meio DMEM. Depois de ressuspendida, a suspensão de células foi filtrada em um filtro de 70 µm (Cell Strainer - Corning®) para a separação de possíveis grumos de células restantes (Figura 7 e anexo 1).

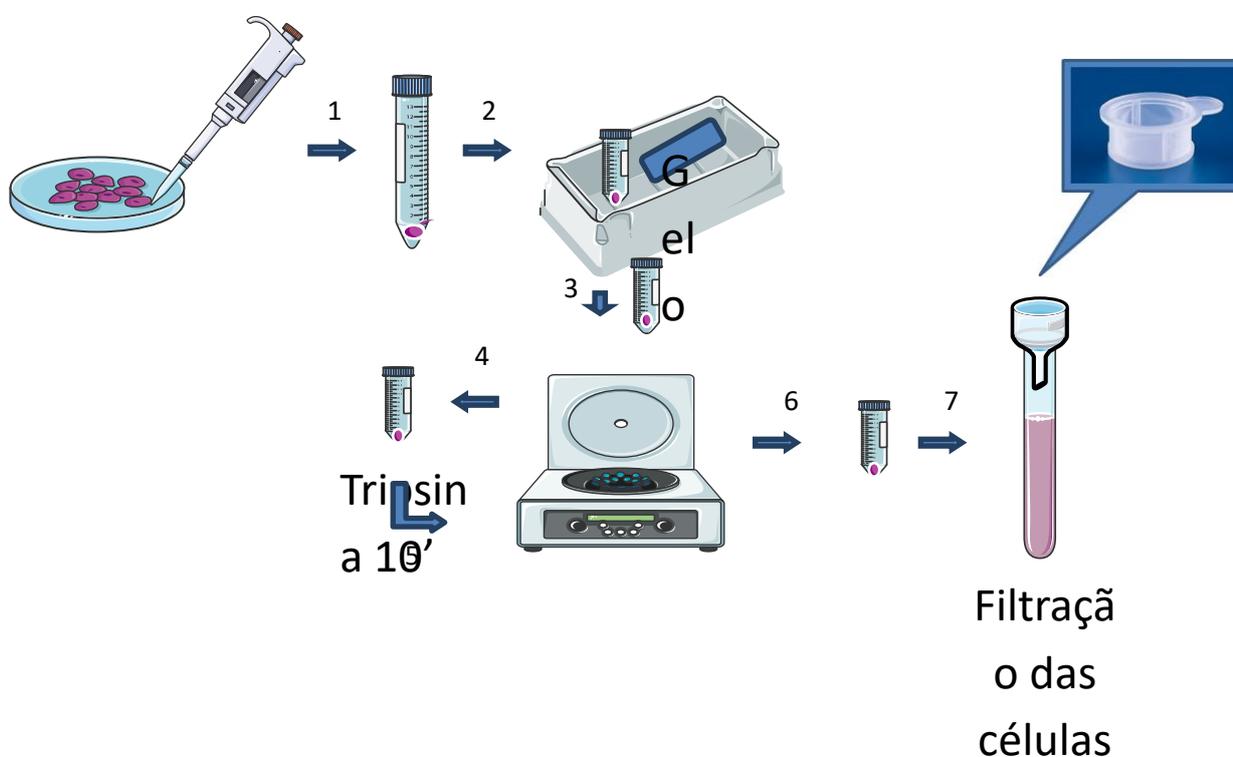


Figura 7 - Esquema representativo do protocolo de isolamento 2 onde utilizamos desagregação enzimática utilizando tripsina seguida de filtração. Após as etapas de isolamento do protocolo 1, neste protocolo, após a ressuspender as células em meio de cultivo, a suspensão de células foi filtrada em filtro para células com poros de 70 µm. Os números juntos às setas indicam a ordem das etapas.

4.3.3. Protocolo 3

Foi acrescentado ao precipitado de células, após a retirada do PBS, 1 mL de tampão amônia-cloro-potássio (ACK Lysing Buffer, Thermo Fisher Scientific®), para

lise de hemácias, e mantido por 10 minutos em banho seco à 37 °C sob agitação a 140 rpm e logo após centrifugado a 750 g à 4 °C por 5 minutos. Após esta etapa, seguiu-se as etapas do protocolo 2 de isolamento (item 4.3.2) (Figura 8 e anexo 1).

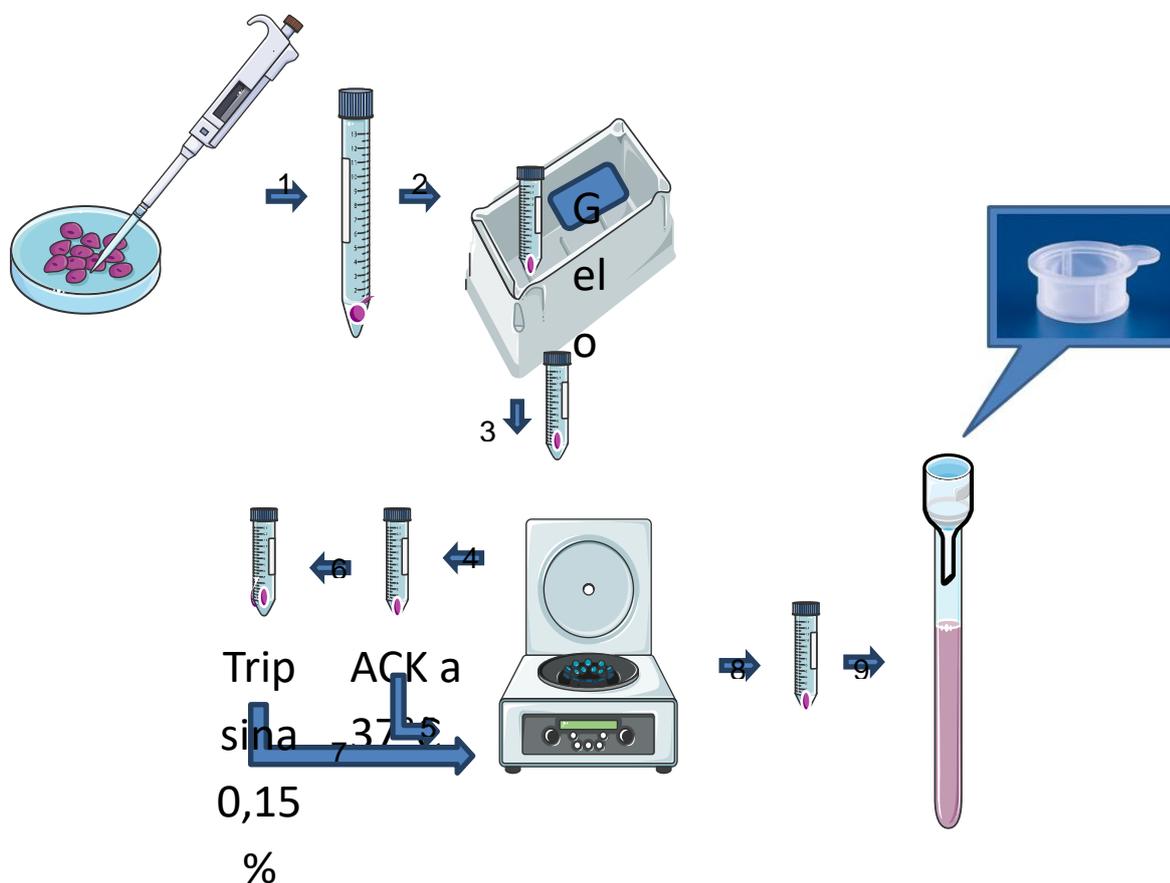


Figura 8 - Esquema representativo do protocolo de isolamento 3 onde utilizamos desagregação enzimática utilizando tripsina seguida do acréscimo de ACK e filtração da suspensão de células. Após chegar ao LET, o tubo contendo as células foi centrifugado para a retirada do PBS e a suspensão de células foi incubada em ACK por 10 minutos. Em seguida o tubo foi centrifugado para a retirada do ACK e as células incubadas em tripsina, seguindo as etapas do protocolo 2. Os números juntos às setas indicam a ordem das etapas.

4.3.4. Protocolo 4

As células da paciente foram divididas em dois tubos, um contendo PBS e outro com o FF dessa mesma paciente que continha menos hemácias. Os dois tubos foram transportados para o LET em uma caixa de isopor com um gelo reciclável e seguimos com as etapas do protocolo de isolamento 3 (item 4.3.3) nos dois tubos. Após retirar o PBS e o FF, as CG foram ressuscitadas em 1 mL de DMEM, contadas em um hemocitômetro e plaqueadas separando as que foram transportadas em PBS das que foram transportadas em FF. As células que restaram

no tubo de transporte e não foram utilizadas, foram unidas em um *pool*, o qual foi contado em hemocítômetro e plaqueado (Figura 9 e anexo 1).

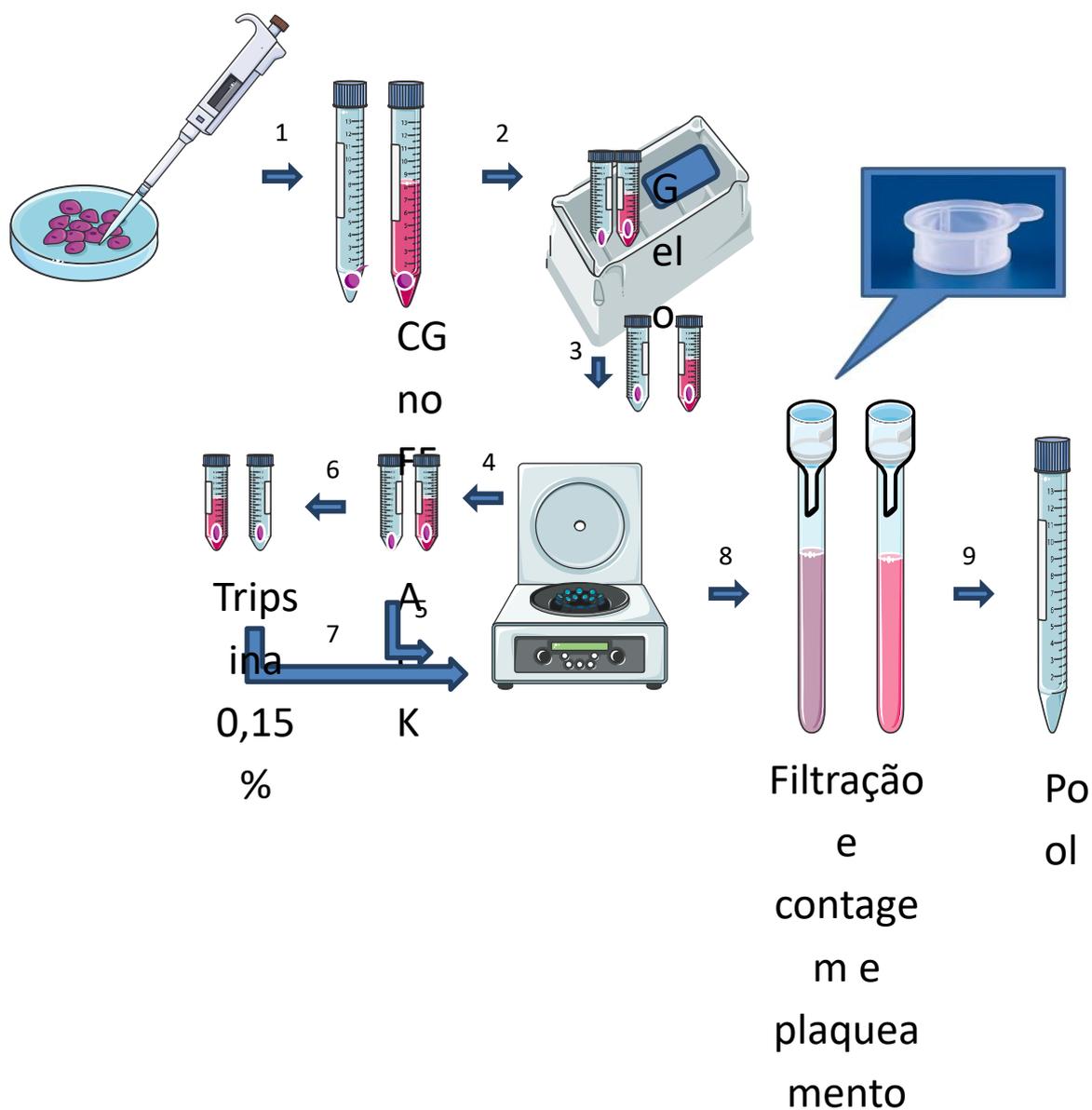


Figura 9 - Esquema representativo do protocolo de isolamento 4 onde utilizamos desagregação enzimática utilizando tripsina seguida do acréscimo de ACK e filtração da suspensão de células, seguindo o protocolo 3. Neste protocolo as células foram transportadas no PBS e no fluido folicular da paciente. Após a chegada no LET os tubos com as CG no PBS e FF passaram pelos processos descritos no protocolo de isolamento 3. Os números juntos às setas indicam a ordem das etapas.

4.3.5. Protocolo 5

Fizemos um experimento utilizando o protocolo 1 de isolamento para comparar a enzima utilizada por nós, a tripsina, com a enzima hialuronidase, utilizada nas clínicas de reprodução assistida para fazer a remoção da camada de CG dos oócitos. Visamos com este experimento verificar com qual enzima conseguiríamos melhor desagregação enzimática e, com isto, uma quantidade maior de células. O experimento realizado como as enzimas está demonstrado na figura 10. Adicionamos gentamicina 2 % no tubo com as células em PBS. Em seguida diluímos na proporção de 5:1 a quantidade de líquido no tubo ACK concentrado. Adicionamos também hialuronidase para concentração final de 40-100 UI. Agitamos manualmente, por aproximadamente 5 minutos, durante o trajeto até a centrifuga com rotor móvel, e centrifugamos por 5 minutos a 4 °C a 750 g para que o sedimento se depositasse no fundo do tubo.

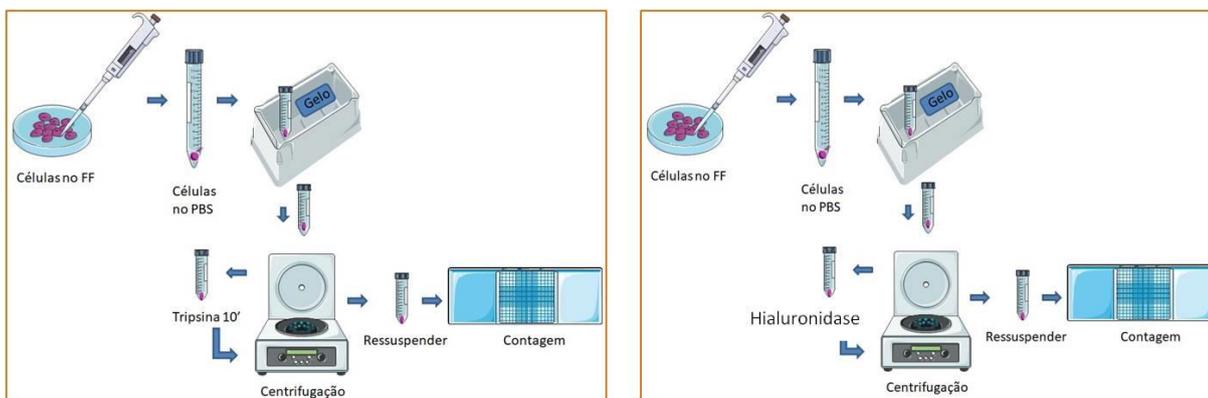


Figura 10 - do experimento comparativo entre as enzimas tripsina e hialuronidase.

Retiramos o sobrenadante e ressuspendemos o sedimento de células em 6 mL de meio DMEM sem soro, acrescido de solução antibiótica e antimicótica contendo 2 % de gentamicina, 2 % de fungizona e 2 % de estreptomicina e penicilina. Foi adicionado 4 mL de Percoll 50 % e 4 mL de PBS acrescido de antibiótico e antimicótico em um tubo de 15 mL. Sobre a camada de Percoll e PBS acrescentamos cuidadosamente a suspensão de células e centrifugamos a 850 g por 25 minutos à temperatura ambiente. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur retiramos a interfase, entre os meios, contendo as células, acondicionamos em um

tubo de 15 mL, acrescentamos 10 mL de PBS com antifúngico e antibiótico, e centrifugamos a 750 g por 10 minutos a 4 °C para a retirada do Percoll. Ressuspendemos o precipitado em 1 mL de DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo ou em CSCM-C e contamos a concentração de células no hemocitômetro, como está descrito no item 4.4 (Figura 11 e anexo 1).

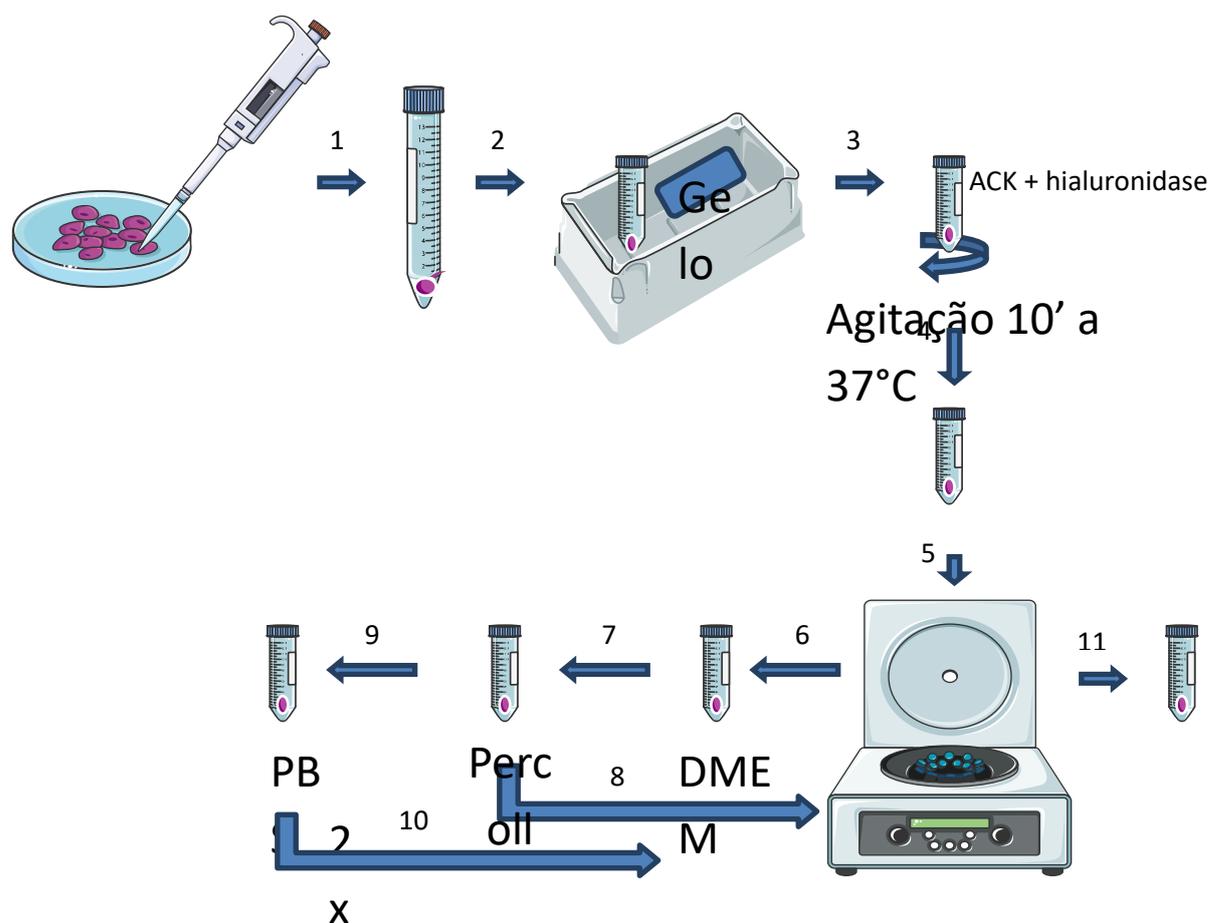


Figura 11 - Esquema representativo do protocolo de isolamento 5 onde utilizamos desagregação enzimática utilizando hialuronidase, ACK e gradiente de Percoll. Após chegar ao LET foi acrescentado ao tubo ACK e hialuronidase ao PBS contendo as células e ficou incubado sob agitação a 30 °C por 10 minutos. Passado esse tempo, o tubo com células foi centrifugado para a retirada do ACK e da enzima e o sedimento de células foi ressuspendido em DMEM. A suspensão de células foi depositada em cima de uma coluna de Percoll e centrifugada para a separação das camadas. A interfase de CG foi lavada em PBS duas vezes e ressuspendida em meio de cultura. Os números juntos às setas indicam a ordem das etapas.

4.3.6. Protocolo 6

Assim que chegou no laboratório, após aproximadamente 45 minutos de transporte, acrescentamos 2 % de gentamicina ao tubo com as células. Centrifugamos para a retirada do PBS e encubamos o sedimento de células em ACK 1x, por 10 minutos, sob agitação de 140 rpm a 37 °C e homogeneizado manualmente (agitando o tubo, a cada 2 minutos). Esta solução foi centrifugada por 5 minutos a 750 g para a retirada do ACK. O precipitado de células, foi ressuscitado em ACK e hialuronidase 5x e 10x concentrados, respectivamente, para as concentrações finais de ACK 1x e hialuronidase 40-100 UI em meio de cultura. Ressuspendemos a solução de células por 2 minutos utilizando uma pipeta sorológica de 10 mL, a fim de realizar uma desagregação mecânica das células. A solução foi então centrifugada a 750 g por 5 minutos, o precipitado foi ressuscitado em meio DMEM acrescido de 2 % de soro de cavalo ou CSCM-C contendo 2% de gentamicina, 2 % de estreptomicina e penicilina e 2 % de fungizona. O número de células foi aferido utilizando o hemocítômetro, descrito no item 4.4 (Figura 12 e anexo 1).

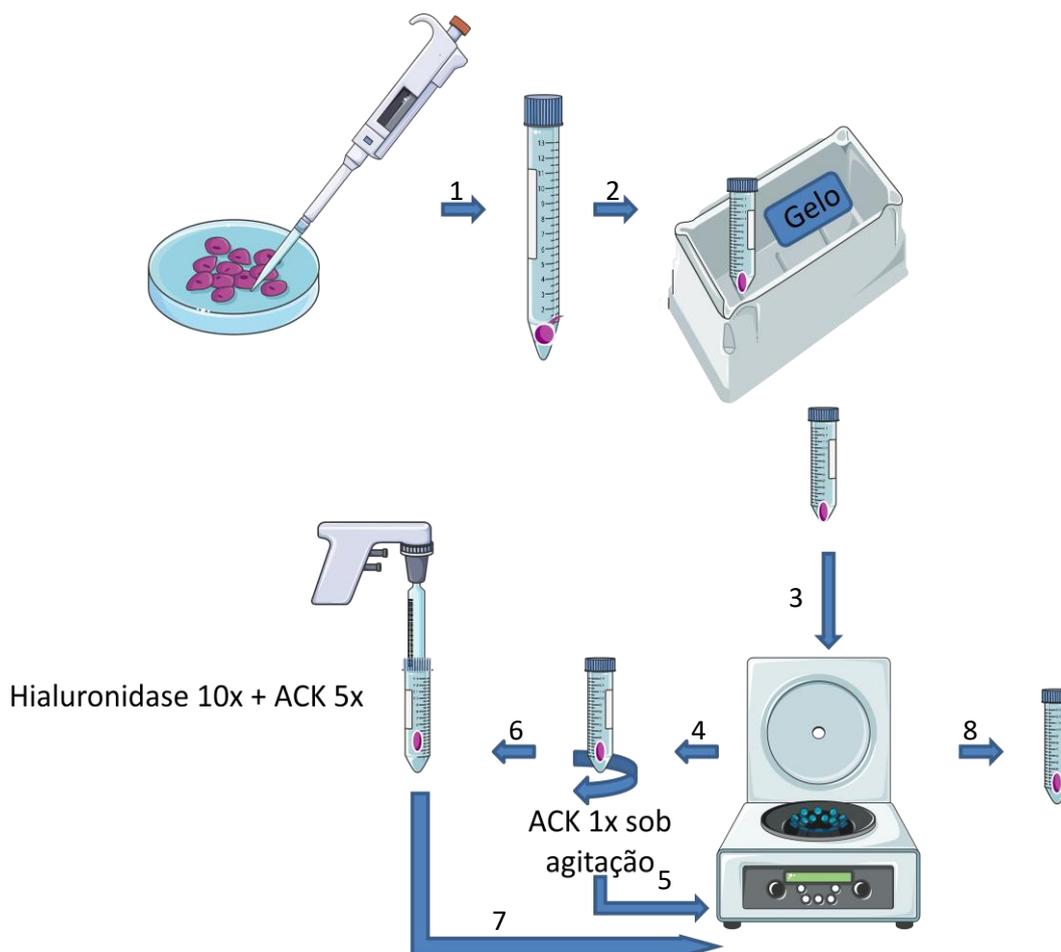
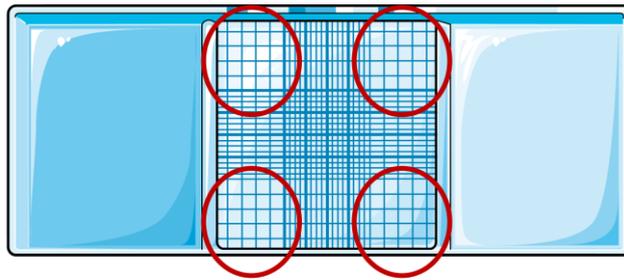


Figura 12 - Esquema representativo do protocolo de isolamento 6 onde utilizamos hialuronidase e ACK concentrados. Chegando Ao LET o tubo com as células foi centrifugado para retirar o PBS, em seguida o sedimento de células foi ressuspenso em ACK e mantido sob agitação, seguido de centrifugação para a retirada do ACK e as células incubadas em ACK concentrado e hialuronidase e agitados manualmente por dois minutos com o auxílio de uma pipeta de 10 mL para uma melhor desagregação mecânica das células. Em seguida o tubo foi centrifugado para a retirada da hialuronidase e do ACK e o sedimento de células ressuspenso em meio de cultura. Os números junto às setas indicam a ordem das etapas.

4.4. Quantificação celular utilizando o hemocitômetro

Após o isolamento das CG, uma alíquota de 10 μ L da suspensão de células foi recolhida, acrescentado 10 μ L de Azul de Trypan 1 mg/mL (Sigma-Aldrich®) e homogeneizado com sucessivas pipetagens. A quantificação foi feita realizando a contagem de células translúcidas dos quatro quadrantes das extremidades, dividindo o valor por 4 (número de quadrantes), multiplicando por 2 (fator de diluição do Trypan), multiplicando por 10^4 (fator de correção do hemocitômetro) e multiplicando o resultado final pelo volume de líquido no tubo para saber a concentração total de células (Figura 13).



Diluição do Tripan

$$\frac{\text{Células translúcidas}}{\text{Nº de quadrantes}} \times 2 \times 10^4 \times \text{Volume de líquido do tubo}$$

\swarrow
 Fator da câmara

Figura 13 - Imagem representativa do hemocitômetro e do cálculo necessário para quantificar concentração de células. Os círculos representam os quadrantes contados para fazer o cálculo de concentração.

4.5. Padronização do meio de cultura utilizado

Após o isolamento, $3,4 \times 10^3$ células/poço foram plaqueadas na placa de 96 poços, obtendo a densidade celular de $1,05 \times 10^4$ células/cm². As células foram cultivadas em triplicata nos diferentes meios (quadro 1). Em todos os meios foram adicionados 2 % de fungizona, 2 % de gentamicina e 2 % de estreptomicina e penicilina. As células foram mantidas na incubadora à 37 °C com atmosfera de 5 % CO₂. O acompanhamento da cultura de células foi realizado por registro fotográfico em microscópio óptico de contraste de fase Fiedman Wolf Leitz. Além disso, o número de células totais foi quantificado 24 horas e 48 horas após o cultivo utilizando a contagem diferencial com coloração de azul de Trypan no hemocitômetro.

Quadro 1 - Meios de cultura

Meio de cultura	Composição
DMEM High Glicose (Dulbecco's MEM Gibco) – DMEM base	Sais inorgânicos (cloreto de cálcio (CaCl ₂), Nitrato de ferro (Fe (NO ₃)), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio (MgSO ₄), cloreto de sódio (NaCl), fosfato monossódico(NaH ₂ PO ₄), aminoácidos (L-arginina, L-cistina, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina e L-valina) ,vitaminas (D-Capantotenato, cloreto de colina, ácido fólico, mio-inositol, niacinamida, piridoxal, riboflavina, tiamina), D-glicose (4.500 mg/L) tampão bicarbonato (3,7 mg/L) e piruvato. Indicador de pH Vermelho de fenol
DMEM High Glicose + soro sintético (Sigma Aldrich) a 2%	DMEM base especificado anteriormente acrescido de 2% soro sintético (albumina sérica bovina, transferrina bovina e insulina bovina)
DMEM High Glicose + soro de cavalo a 2% (Thermo Fisher Scientific)	DMEM base especificado anteriormente acrescido de 2% de soro de cavalo
Continuous Single Culture Medium (CSCM-C) Complete (Irvine Scientific)	Sais e íons (cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio), tampão bicarbonato, antioxidantes (EDTA e citrato de sódio), indicador de pH vermelho de fenol, aminoácidos (alanina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, prolina, serina, arginina, sistina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina e valina) ,dipeptídeo (alanil,-glutamina), substratos energéticos (piruvato de sódio, glicose e L-lactato de sódio), e suplementação com 10% de albumina sérica humana

O método de estabelecimento da densidade celular da cultura de CG foi baseado de acordo com a indicação do fabricante da placa. As células foram cultivadas em placas de 96 poços e cada condição foi feita em triplicata.

4.6. Estatística

Os dados foram apresentados com média e desvio padrão da média ou imagens representativas do experimento. A análise estatística dos resultados foi realizada com o software *GraphPad Prism 5* pelo teste ANOVA *One-way*. Foi considerado o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Não foram realizados pós-testes visto que em nenhuma de nossas análises observamos $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Perfil das pacientes

O perfil das pacientes envolvidas no estudo encontra-se na tabela 1. Observamos que houve uma grande variação na contagem de folículos antrais entre as pacientes, como pode ser observada pelo desvio amostral. Esta diferença também repercutiu no número de células obtidas por pacientes. O perfil das pacientes está apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Perfil das pacientes

Pacientes recrutadas	37
Idade média das pacientes	37 ± 3,4
Contagem de folículos antrais	14,9 ± 10,5
Número de oócitos coletados/ paciente	10,3 ± 6,8
Número de oócitos / folículos antrais	14,9 ± 10,3

5.2. Resultado do protocolo de isolamento 1

Utilizando o protocolo de isolamento 1 utilizando a tripsina foi possível obter CG isoladas. Contudo, pudemos observar agregados celulares e presença de hemácias na suspensão de células obtida (Figura 14).

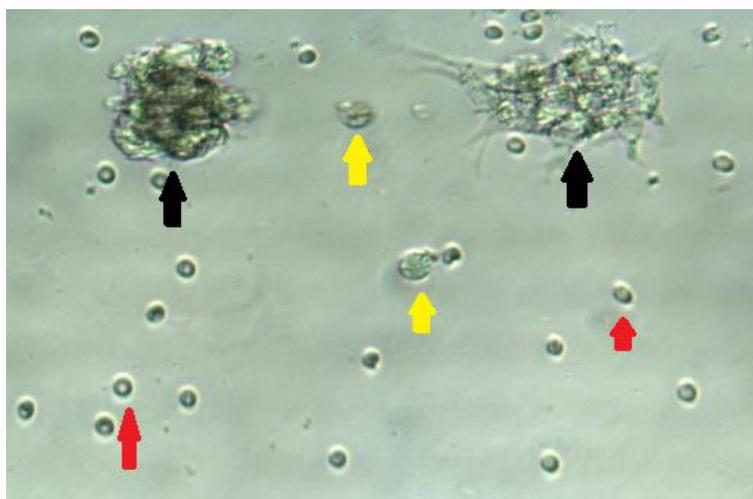


Figura 94 - Fotomicrografia das CG isoladas utilizando o protocolo 1. As setas pretas representam os agregados celulares, as setas vermelhas as hemácias e as setas amarelas as CG isoladas. Aumento de 20x em contraste de fase. Imagem representativa de três experimentos independentes.

5.3. Resultado do protocolo de isolamento 2

A adição do filtro para células no protocolo 2 auxiliou o isolamento. A cultura das CG obtidas pelo protocolo 2 não apresentou agregados de células como é possível observar na figura 15. Contudo, ainda observamos uma grande quantidade de hemácias na suspensão de células.

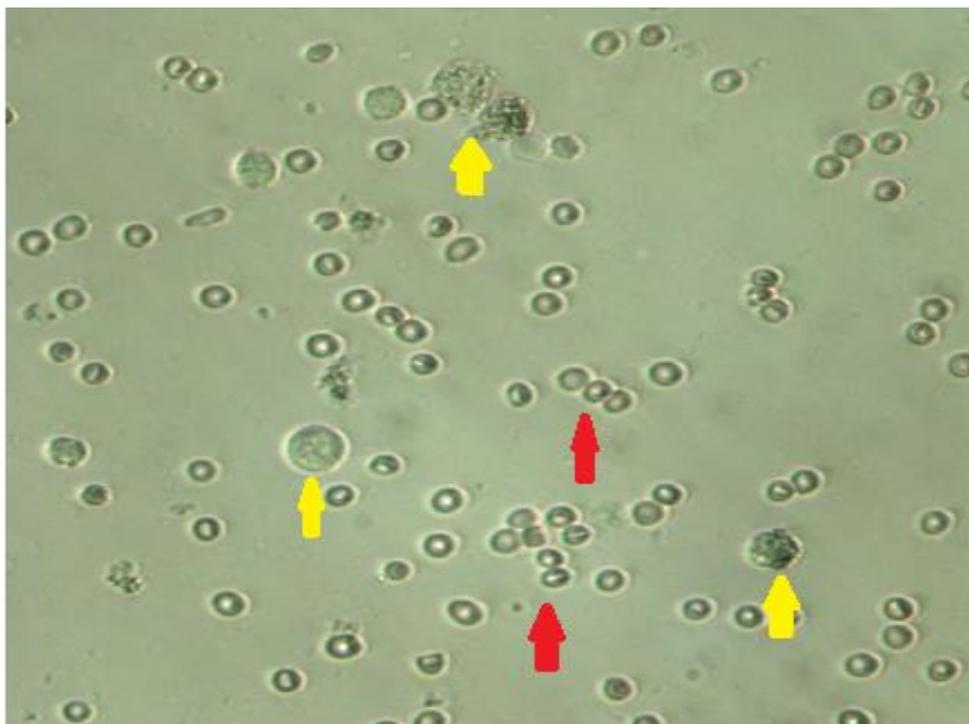


Figura 15 - Fotomicrografia das CG isoladas utilizando o protocolo 2. A figura já não apresenta agregados celulares, as setas vermelhas representam as hemácias e as setas amarelas as CG isoladas. Aumento de 20x em contraste de fase. Imagem representativa de 4 experimentos independentes.

5.4. Resultados do protocolo de isolamento 3

Apesar de termos observado que o protocolo 2 foi eficiente em reduzir os agregados celulares, ainda era possível observar hemácias na cultura (Figura 15). Portanto, o acréscimo o tampão de lise de hemácias ACK ao processamento das CG, formando o protocolo 3, resultou em uma suspensão de células isoladas e livre de agregados e hemácias evidenciado na figura 16.

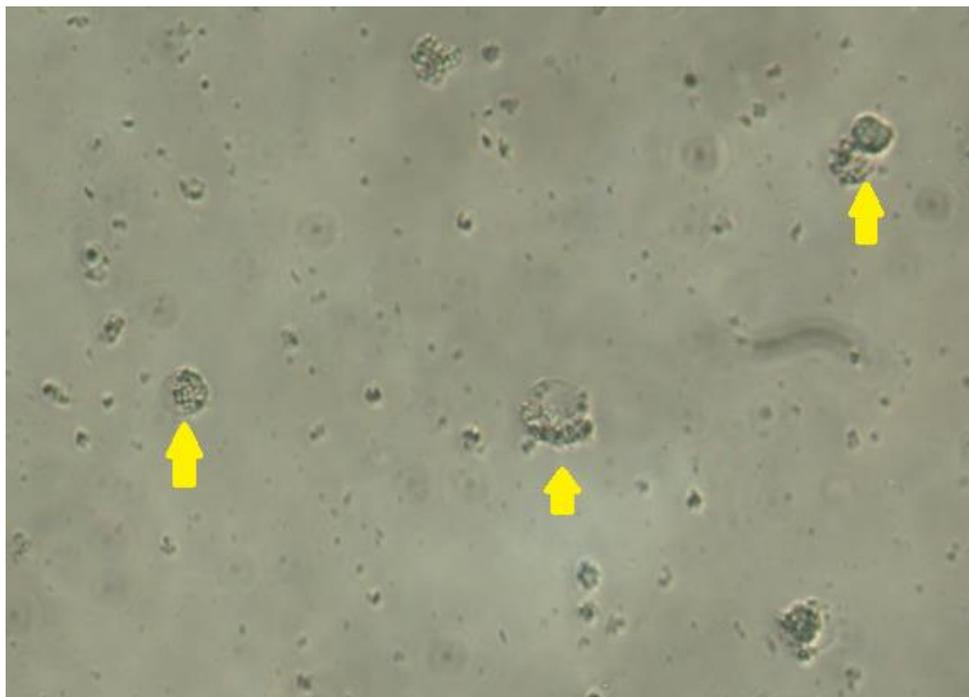


Figura 16 - Fotomicrografia das CG isoladas utilizando o protocolo 3. As setas amarelas indicam as CG isoladas. Nota-se que não há presença de agregados celulares e nem hemácias. Aumento de 20x em contraste de fase. Imagem representativa de 5 experimentos independentes.

5.5. Comparação dos diferentes meios de cultivo

Após a determinação do melhor protocolo de isolamento passamos a investigar o melhor meio de cultivo das CG humanas. Para tal, cultivamos as CG isoladas a partir do protocolo 3 no meio de cultivo padrão de embriões, CSCM-C e em meio DMEM, com diferentes suplementações (quadro 1). Observamos que a viabilidade das células em 24 horas reduziu em todas as condições de cultivo (Figura 18). Contudo, os melhores resultados foram obtidos com o meio CSCM-C e DMEM suplementado com HS, sendo possível observar um maior número de células nestas condições (figura 17 A, C E). Em 48 horas de cultivo, foi possível observar que não há perda importante no número de células (figura 17 B, D, F) (Figura 18). Para cada condição e meio de cultivo os experimentos foram feitos em triplicata.

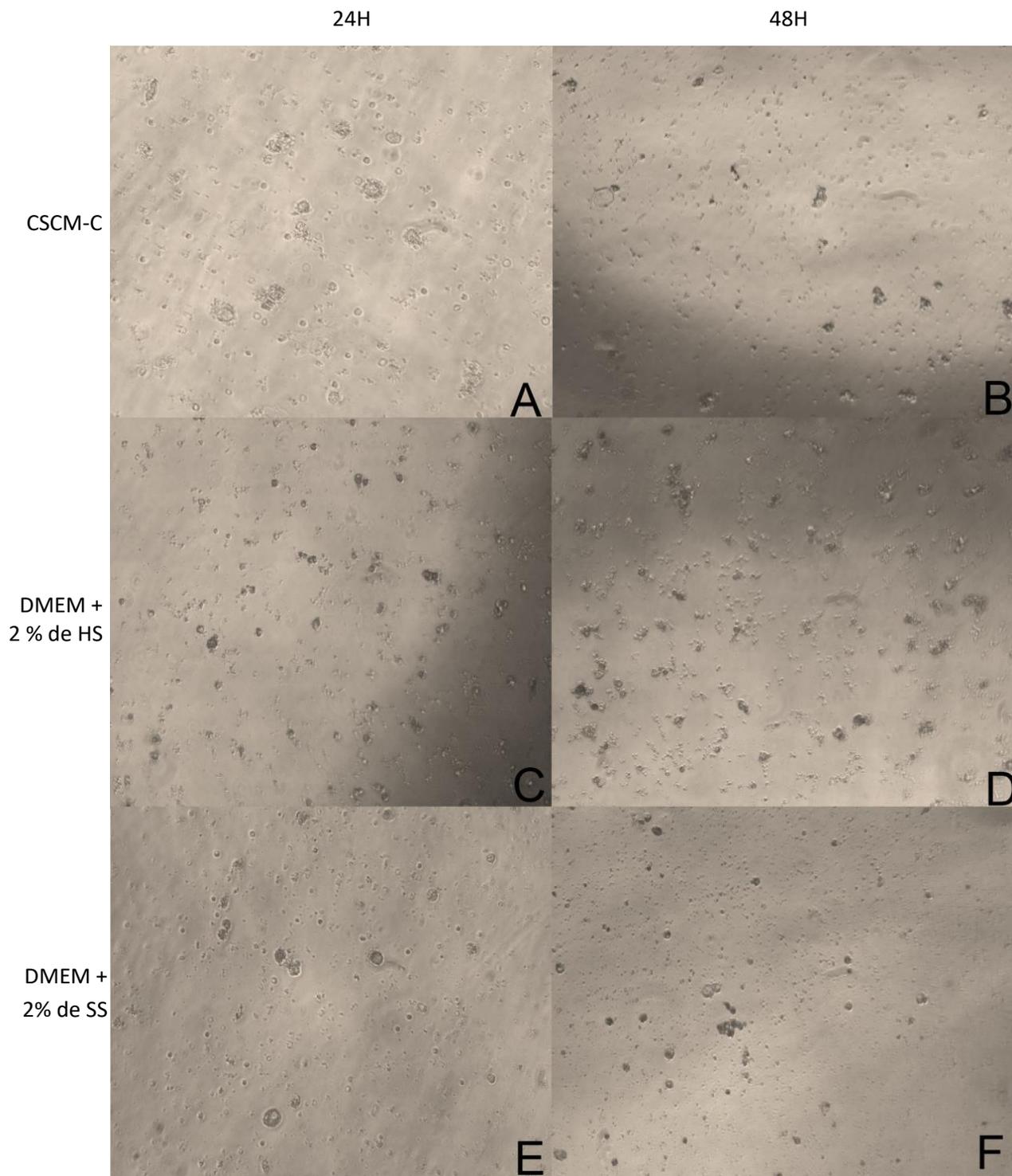


Figura 17 – Imagem das CG isoladas utilizando os diferentes meios de cultura e suplementos no período de 24 e 48 horas utilizando o número de células de $3,4 \times 10^3$. As figuras apresentam as CG em cultivo nos meios CSCM-C, DMEM + 2 % de HS e em cultivo com DMEM + 2 % de SS. Aumento de 10x em contraste de fase. Imagem representativa de um a dois experimentos independentes.

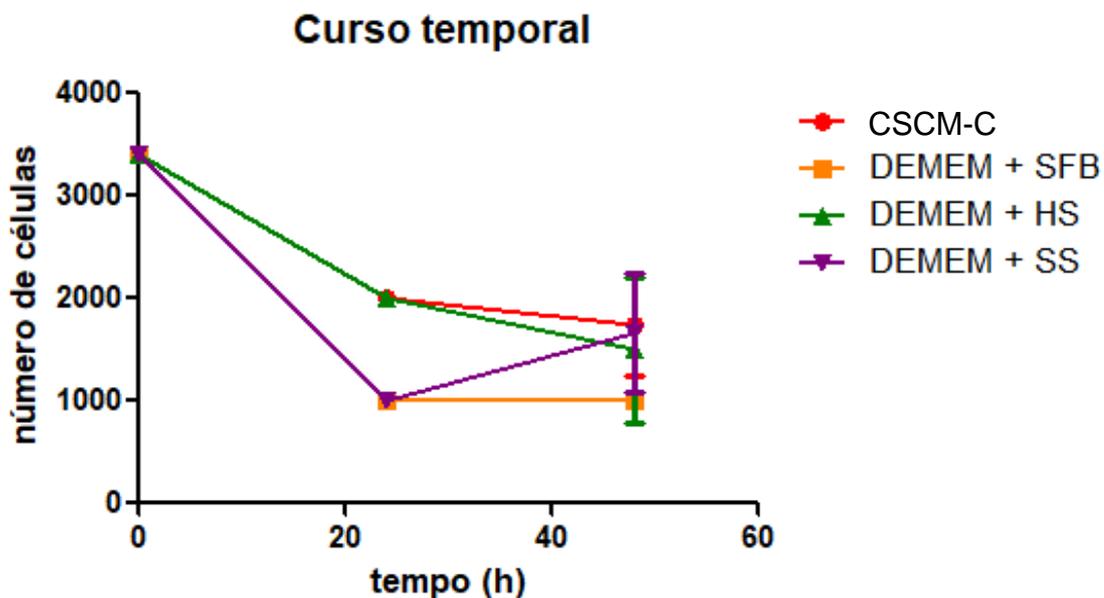


Figura 18 – Gráfico ilustrativo do curso temporal dos períodos de 24 horas e 48 horas de cultivo nos diferentes meios de cultivo que apresentou que o número de células semelhantes no CSCM-C e no DMEM + HS.

5.6. Resultados do protocolo de isolamento 4

Tendo em vista os resultados do protocolo 3 visamos aprimorar a condição de transporte das células para aumentar o rendimento do isolamento das CG do aspirado folicular até o LET. Neste protocolo buscamos ver qual o melhor meio para transportar as CG. Sendo assim, no protocolo de isolamento 4, assim como no protocolo 3, conseguimos isolar as CG sem agregados celulares. Nas células transportadas no FF encontramos hemácias na suspensão de células como podemos observar na figura 19.

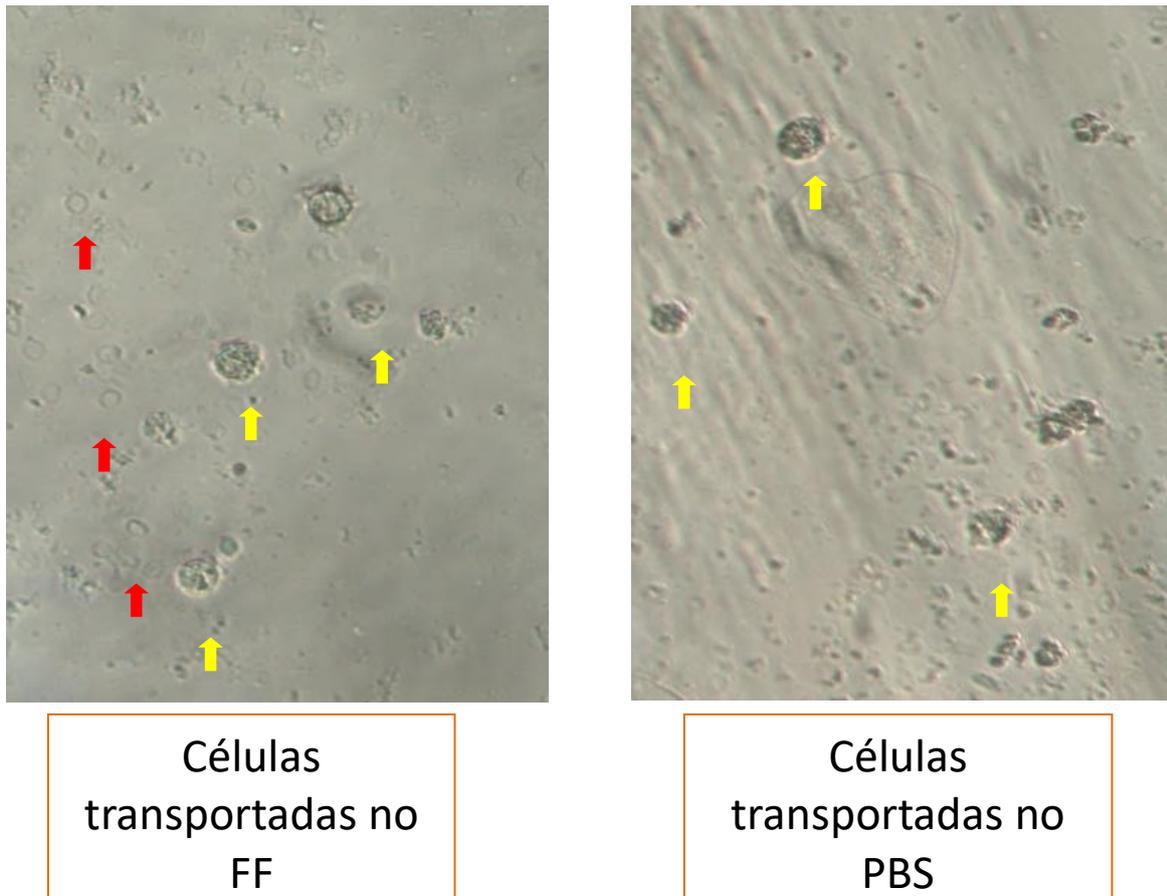


Figura 19 - Fotomicrografia das CG isoladas utilizando o protocolo 4. Suspensão de células sem agregados celulares. As setas vermelhas representam as hemácias e as setas amarelas as CG isoladas. Aumento de 20x em contraste de fase. Imagem representativa de 3 experimentos independentes.

Fazendo uma comparação entre a quantidade de CG obtidas transportadas no PBS e no FF, tivemos como resultado o gráfico representado na figura 20.

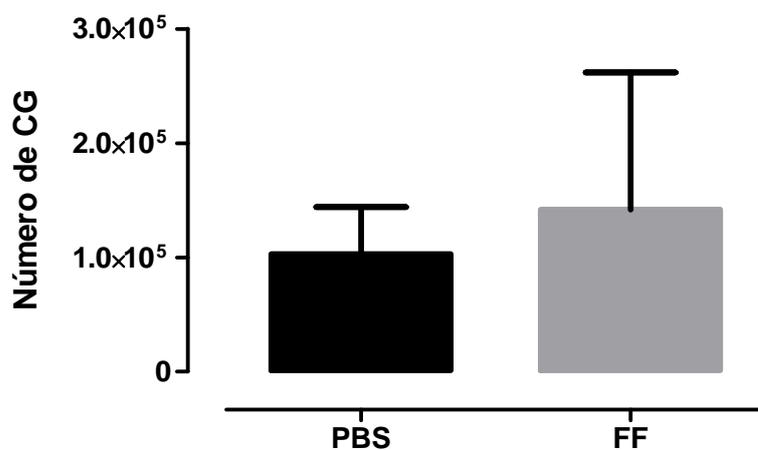


Figura 20 – Gráfico do número de células obtidas quando transportadas no PBS (barra preta) e no FF (barra cinza). Dados apresentados como média ± desvio padrão da média. A diferença entre o número de células não foi estatisticamente significativa.

5.7. Resultados do protocolo de isolamento 5

No teste de desagregação enzimática obtivemos um resultado de 10^3 células utilizando a tripsina e 10^5 células utilizando a hialuronidase. Com isto, passamos a substituir a tripsina pela hialuronidase na desagregação enzimática.

Como resultado do protocolo de isolamento 5, obtivemos um protocolo que levou uma quantidade maior de tempo em comparação aos protocolos 1, 2 e 3 (Figura 21). O número de células obtidas foi muito variável e semelhante ao que havia sido obtido nos protocolos anteriores ($4,9 \times 10^5 \pm 3,9 \times 10^5$; figura 23). O resultado que obtivemos com o isolamento realizado com o protocolo 5 está apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos com o protocolo 5

Nº de pacientes	5
Idade das pacientes	$36,6 \pm 1,51$
Nº de oócitos coletados	$10,4 \pm 3,36$
Nº de células obtidas	$4,9 \times 10^5 \pm 3,9 \times 10^5$

5.8. Resultados do protocolo de isolamento 6

Neste protocolo seguimos utilizando a hialuronidase para realizar a desagregação enzimática das células. Com este protocolo, assim como, nos protocolos 3, 4 e 5 conseguimos obter as CG isoladas, com suspensão de células sem agregados celulares e livre de hemácias (Figura 22). Podemos observar na figura 23 um comparativo da quantidade de células obtidas em cada protocolo.

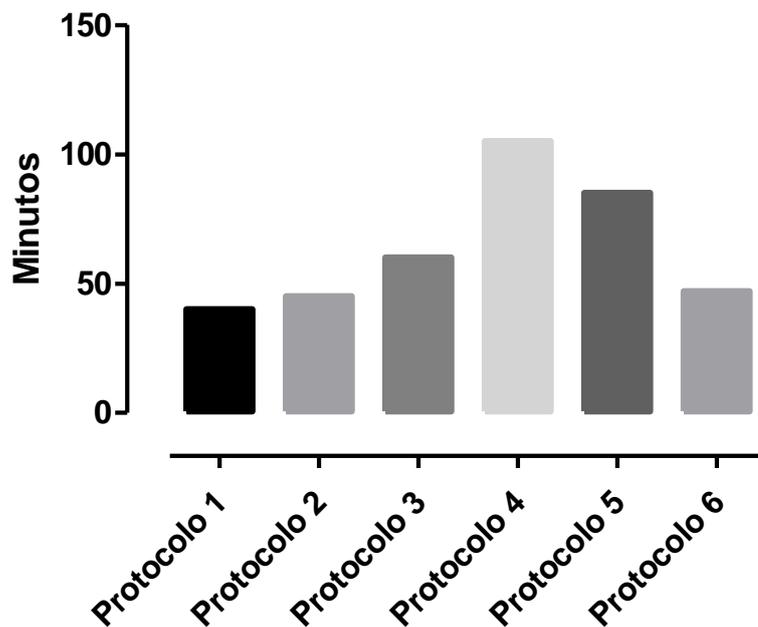


Figura 21 - Gráfico comparativo do tempo utilizado em cada protocolo desenvolvido, com destaque ao 6 onde o tempo só pode ser comparado ao 1 e 2, sendo que estes não obtivemos uma suspensão de células homogêneas.

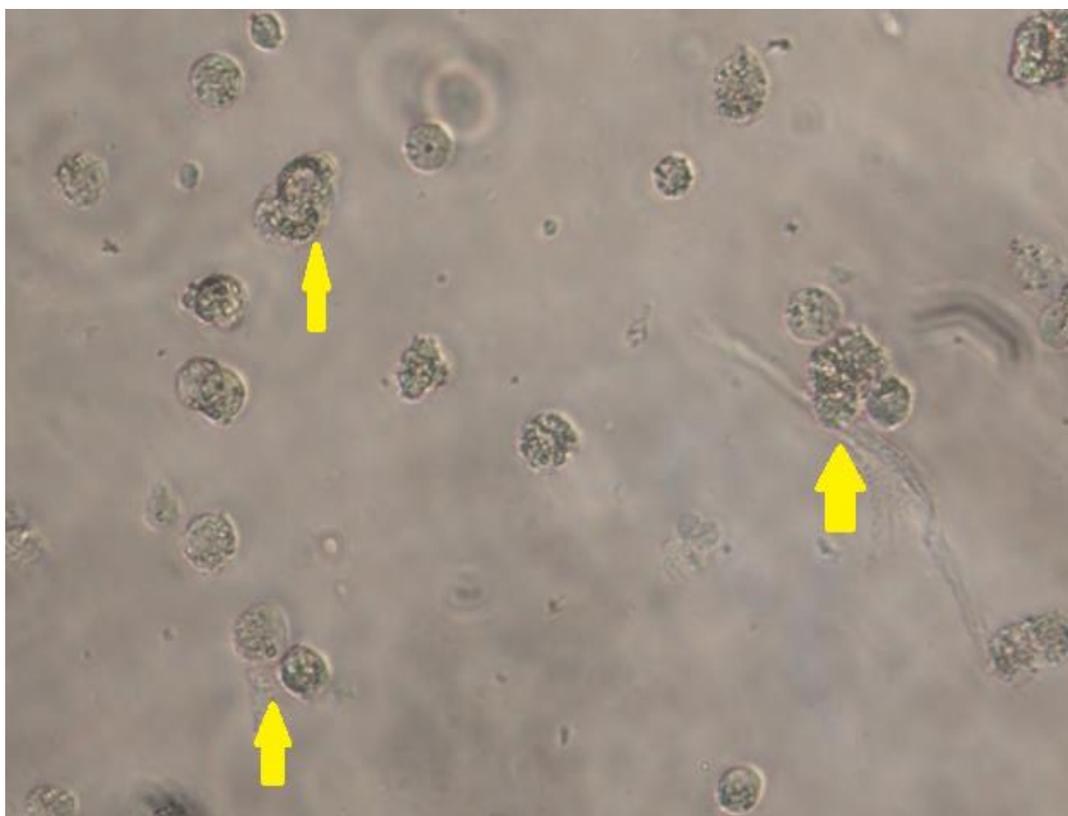


Figura 22 - Fotomicrografia das CG isoladas utilizando o protocolo 6. Suspensão de células sem agregados celulares. As setas amarelas as CG isoladas. Aumento de 20x em contraste de fase. Imagem representativa de 8 experimentos independentes

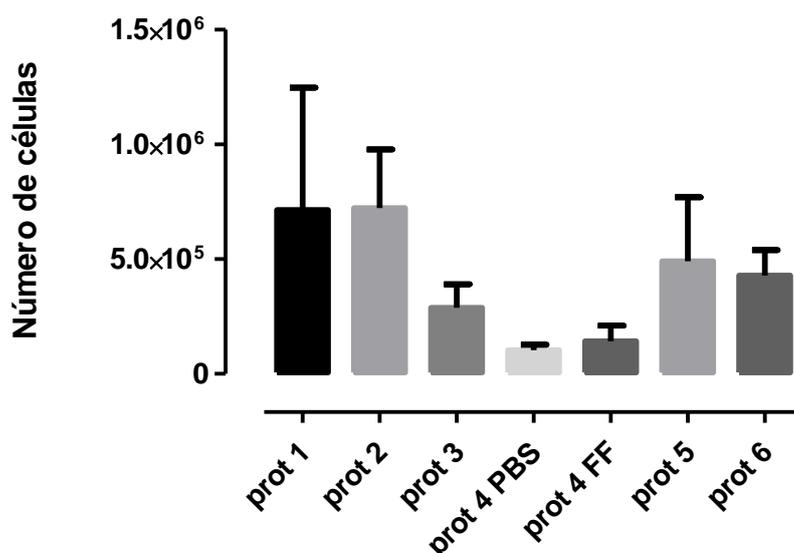


Figura 23 - Gráfico comparativo da quantidade de células obtidas em cada protocolo desenvolvido do 1 ao 6

5.9. Levantamento de custo de cada protocolo por caso

Fizemos um levantamento do gasto necessário para realizar um caso de cada protocolo. Os valores de material e custo de mão de obra estão apresentados na tabela 4. O levantamento do custo da mão de obra necessária para realizar os protocolos foi baseado no trabalho de AGUIAR, 2018.

Tabela 4 - Levantamento do gasto de cada protocolo

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5	Protocolo 6
Enzima	R\$ 0,72	R\$ 0,72	R\$ 0,72	R\$ 0,72	R\$ 3,84	R\$ 3,84
pipetas sorológicas	R\$ 5,20	R\$ 6,50	R\$ 9,10	R\$ 19,50	R\$ 13,00	R\$ 7,80
Tubo cônico 15 mL	R\$ 0,50	R\$ 0,50	R\$ 0,50	R\$ 1,00	R\$ 1,00	R\$ 0,50
Tubo cônico 50 ml	*	R\$ 0,80	R\$ 0,80	R\$ 1,60	*	*
PBS	R\$ 0,40	R\$ 0,40	R\$ 0,40	R\$ 0,80	R\$ 0,40	R\$ 0,40
Ponteiras	R\$ 0,90	R\$ 0,90	R\$ 0,90	R\$ 1,80	R\$ 1,50	R\$ 1,80
filtro	*	R\$ 13,70	R\$ 13,70	R\$ 27,40	*	*
ACK	*	*	R\$ 1,70	R\$ 1,70	R\$ 1,70	R\$ 1,70
Percoll	*	*	*	*	R\$ 10,00	*
custo laboratorial	R\$ 53,60	R\$ 60,30	R\$ 87,10	R\$ 134,00	R\$ 113,90	R\$ 62,98
Custo total (R\$)	R\$ 61,32	R\$ 83,82	R\$ 114,92	R\$ 188,52	R\$ 145,34	R\$ 79,02

6. Discussão

No presente trabalho desenvolvemos um protocolo de isolamento de CG humanas que pudesse ser empregada em clínicas de reprodução assistida. O protocolo pode ser utilizado como uma forma de auxílio no tratamento de casais inférteis, em co-cultivo com oócitos favorecendo sua maturação e com embriões ajudando no seu desenvolvimento. Há indícios recentes que demonstram o benefício do co-cultivo de oócitos imaturos com CG, facilitando a maturação e fertilização deste, como é demonstrado por VIRANT-KLUN et al., 2018. Ademais, as CG humanas podem ser utilizadas na pesquisa básica e translacional em projetos relacionados à reprodução humana.

No primeiro protocolo desenvolvido por nós, utilizando apenas o método de digestão enzimática com a tripsina, apesar de ser o mais simples, conseguimos isolar as CG. A partir do protocolo 1 foi possível concluir que o tratamento enzimático com tripsina possibilitou o isolamento de CG a partir do FF das pacientes. No entanto, não ofereceu resultados adequados pois ainda observamos muitos agregados celulares, impossibilitando a determinação precisa da viabilidade e densidade celular. Também observamos grande quantidade de hemácias (Figura 14).

Já no protocolo 2, utilizamos uma barreira física de seleção negativa dos agregados celulares. Como resultado obtivemos uma suspensão de células livre de agregados celulares. No entanto, ainda observamos a presença de hemácias na suspensão (Figura 15). Como as hemácias lisadas, liberam ferro e este pode gerar radicais livres, que podem gerar danos no DNA de gametas e prejudicando a implantação embrionária (MÁTÉ; BERNSTEIN; TÖRÖK, 2018), seguimos para mais uma etapa no protocolo. Sendo assim, o protocolo 3 contou com o acréscimo do tampão ACK para a lise de hemácias. Nossos dados demonstraram que este protocolo foi o que obtivemos os resultados mais promissores até o momento.

Visando aumentar a quantidade de células que estávamos obtendo, realizamos alteração no transporte das células. Fizemos o teste alterando o meio de transporte das células entre a clínica Fertipraxis e o LET. Parte das células foram transportadas em PBS, como anteriormente realizado, e a outra parte no FF da

paciente, protocolo 4. Neste protocolo observamos uma tendência a um maior número de células utilizando o transporte no FF. Contudo, o uso do FF foi descartado, pois observamos um número muito maior de hemácias que não foram eliminadas completamente com a utilização do ACK. As hemácias do FF se sedimentavam no fundo junto com as células e, mesmo utilizando o ACK, no final do processo ainda encontrávamos hemácias na suspensão de células. Além das hemácias, para evitar variabilidades entre pacientes, optamos por utilizar o material sempre da mesma paciente. A sedimentação das hemácias com as CG dificultava a análise e nossos dados preliminares não demonstraram resultados positivos importantes utilizando o FF, sendo este descartado.

Tendo em vista que não obtivemos sucesso no protocolo 4, e por o protocolo 3 possuir muitas etapas, buscamos otimizar o processo de isolamento e tentamos unir o processo de lise de células sanguíneas e a desagregação das células em uma única etapa. Com isso, desenvolvemos o protocolo de número 5, onde acrescentamos o ACK concentrado ao PBS onde as células foram transportadas e a enzima hialuronidase concentrada utilizada para a desagregação celular. Esta enzima está presente no acrossoma dos espermatozoides que permite a sua passagem até alcançar o óvulo e é utilizada nas clínicas de reprodução assistida para a denudação dos oócitos para a fertilização *in vitro* (PEREIRA et al., 1997). A partir deste protocolo, passamos a acrescentar antibióticos e antifúngico à suspensão de células para reduzir as chances de contaminação da cultura. Neste protocolo a suspensão de células foi separada utilizando o gradiente de Percoll, para uma melhor separação das células agregadas. Ainda visando uma maior quantidade de células, seguimos para o uso do gradiente de Percoll. A saber, para o uso em células humanas é mais recomendado o uso do gradiente de Ficoll, no entanto, só tínhamos em nosso laboratório o Percoll, e o usamos com o propósito de fazer uma análise inicial com o que tínhamos disponível. Centrifugação por gradiente de concentração já havia sido utilizado em outros protocolos de isolamento das CG (FÖLDESI; BRECKWOLDT; NEULEN, 1998; QUINN et al., 2006; VIREQUE et al., 2013; LEONI; NAITANA, 2018). Sendo assim, desenvolvemos o protocolo 5, visando obter uma quantidade maior de células e diminuir a quantidade de centrifugações. Como resultado obtivemos um protocolo que levou uma quantidade maior de tempo em comparação aos outros protocolos e, ao contrário do que esperávamos, a quantidade de células obtidas foi menor. Ademais o tempo de centrifugação

necessário seria inviável em clínicas de reprodução assistida. Se através desse protocolo tivéssemos obtido bons resultados o Percoll seria substituído pelo Ficoll, visto que o Percoll não poder ser utilizado em clínicas de reprodução por ser tóxico para os gametas (HERNANDEZ-LOPEZ et al., 2005). Passamos então para o protocolo de isolamento 6, neste utilizamos a hialuronidase e ACK concentrados e fizemos desagregação mecânica, num processo semelhante ao utilizado na denudação dos oócitos para retirar a camada de células da granulosa. Com este protocolo não diminuimos a quantidade de etapas, em comparação aos protocolos 1, 2 e 3, mas conseguimos desagregar grande quantidade de células e retirar as hemácias da suspensão de células em tempo semelhante aos protocolos 1 e 2. Apesar de terem sido realizados em tempos aproximados, o protocolo 6 cumpriu com as expectativas de isolar as células e não termos hemácias na suspensão, ao contrário dos protocolos 1 e 2.

No trabalho desenvolvido por Vireque e colaboradores (2013) foi demonstrado o isolamento das CG, contudo, mesmo seguindo um protocolo semelhante ao usado no trabalho deles, o protocolo 5, não conseguimos obter um número de células próximo ao obtido por eles e não pudemos fazer um comparativo do meio de cultivo utilizado pois um dos utilizados estava sob pedido de patente. Comumente os artigos citam trabalhos anteriores para descrever o isolamento das células como trabalho de Portela e colaboradores (2010). Contudo, não é incomum a busca do protocolo levar a mais de cinco artigos diferentes citando trabalhos anteriores com modificações, o que dificulta o entendimento real da metodologia utilizada. Já no trabalho de Virant-Klunt (2018) as CG só são obtidas após a passagem dos oócitos na hialuronidase para a denudação e retirada da camada de células que o reveste, fazendo com que o número de células obtidas seja reduzido. No nosso trabalho, demonstramos empiricamente diferentes metodologias de isolamento das CG que podem ser reproduzidas em clínicas de reprodução assistida.

Fizemos um levantamento do material necessário em cada protocolo e com isso o gasto de cada um. Pudemos notar que os protocolos com menores gastos são o 1 e 6. Sendo o 6, entre estes o com resultado final mais satisfatório. O protocolo 6 também foi vantajoso em relação ao seu tempo de execução, quando considerada a qualidade da suspensão celular obtida.

Dentro das clínicas de reprodução, o uso do meio DMEM e do soro de cavalo não poderia ser realizado pois os meios de cultura não podem ser de origem animal e precisam ser testados para toxicidade de gametas. Mas pudemos observar que o meio CSCM-C, utilizado para cultivo de embriões teve efeitos promissores no cultivo. Sendo assim, recomendamos o CSCM-C para o isolamento em clínicas de reprodução assistida. Contudo, o meio CSCM-C apresenta um alto custo, portanto sugerimos a utilização do meio DMEM suplementado com 2 % de HS para a pesquisa científica.

A partir dos dados obtidos no presente trabalho podemos demonstrar que é possível realizar o isolamento de CG obtidas de clínicas de reprodução assistida em laboratórios de pesquisa básica. Nossos achados sugerem que o protocolo 6 seja o mais indicado para a utilização tanto na prática clínica como na pesquisa científica, por apresentar os melhores resultados de isolamento, com menor custo e tempo viável, sem atrapalhar a rotina do laboratório; e os meios de cultivo CSCM-C e DMEM suplementado com 2 % de HS são os mais indicados para clínica e pesquisa respectivamente.

7. Perspectivas

Este trabalho tem como perspectiva buscar e empregar um marcador específico de CG para confirmar, através de imunohistoquímica ou citometria de fluxo, que a suspensão de células obtidas após o processamento é homogênea em CG.

Além disso, também seria importante aumentar as análises de viabilidade e qualidade das CG após o congelamento e descongelamento das mesmas.

8. Referências

- AGUIAR, L. **Análise comparativa dos microambientes formados na cultura de pré-embriões no dispositivo INVOCeCell e na técnica de fertilização in vitro convencional.** [s.l.] Universidade Federal do rio de Janeiro, 2018.
- AIRES, M. DE M. **Fisiologia.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ANDRADE, G. M. **Prospecção retrospectiva de lipídios presentes no líquido folicular associados ao potencial de desenvolvimentos dos oócitos.** [s.l.] Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- ARAÚJO, G. S. et al. Massa corporal, imagem corporal e desejo por tratamentos estéticos nas diferentes fases do ciclo menstrual. **Saúde Santa Maria**, v. 41, n. 1, p. 77–84, 2015.
- ARRUDA, P. O.; SILVA, I. M. D. C. Estudo das emissões otoacústicas durante o ciclo hormonal feminino. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 74, n. 1, p. 106–111, 2008.
- ASSIDI, M. et al. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 2, p. 209–222, 2008.
- BABINSKI, M. A. Anatomia dos ovários: considerações clínico-patológicas. **Acta Scientiae Medica**, v. 5, n. 2, p. 43–52, 2012.
- BASUINO, L.; SILVEIRA, C. F. Human follicular fluid and effects on reproduction. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 20, n. 1, p. 38–40, 2016.
- BELANI, M. et al. Dual effect of insulin resistance and cadmium on human granulosa cells - In vitro study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 313, p. 119–130, 2016.
- BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. 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, p. 824–840, 2006.

CAMPOS, C. O. et al. Influência da interação entre os oócitos e as células da granulosa nos resultados dos procedimentos de reprodução assistida. **Femina**, v. 39, n. 4, p. 207–216, 2011.

CHEN, X. et al. Micromechanical Analysis of the Hyaluronan-Rich Matrix Surrounding the Oocyte Reveals a Uniquely Soft and Elastic Composition. **Biophysical Journal**, v. 110, n. 12, p. 2779–2789, 2016.

CONTO, E. DE. **Avaliação da frequência de polimorfismos dos genes GDF-9 (c . 398- 39C > G , c . 436C > T , c . 447C > T , c . 546G > A , c . 557C > A e c . 646G > A), AMH (p.Ile49Ser) e AMHR2 (-482A>G) em mulheres inférteis com endometriose.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

CROCOMO, L. F. et al. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 36, p. 25–31, 2012.

DENTIS, J. L. et al. Effects of angiogenin on granulosa and theca cell function in cattle. **Animal**, v. 11, n. 5, p. 811–819, 2017.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829–838, 2001.

FENG, Y. et al. CLARITY reveals dynamics of ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44810, 2017.

FÖLDESI, I.; BRECKWOLDT, M.; NEULEN, J. Oestradiol production by luteinized human granulosa cells: Evidence of the stimulatory action of recombinant human follicle stimulating hormone. **Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 1455–1460, 1998.

FRAGOULI, E. et al. Alteration of gene expression in human cumulus cells as a potential indicator of oocyte aneuploidy. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 27, n. 8, p. 2559–68, 2012.

FRAGOULI, E.; LALIOTI, M. D.; WELLS, D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2014.

FREITAS, C. et al. Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. **Journal of Ovarian Research**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

- GASPARIN, A. A. et al. Anti-Müllerian hormone levels as a predictor of ovarian reserve in systemic lupus erythematosus patients: a review. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, p. 363–367, 2015.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159–177, 2008.
- GOTTARDI, F. P. et al. Efeito das células do cumulus e cisteamina durante o cultivo de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 245–252, 2012.
- GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, n. 2, p. 82–94, 2009.
- GUERREIRO, D. D. et al. Impacto dos agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das biotécnicas reprodutivas na preservação da fertilidade humana. **Reprodução & Climatério**, v. 30, n. 2, p. 90–99, 1 maio 2015.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HATZIRODOS, N. et al. Transcriptomal profiling of bovine ovarian granulosa and theca interna cells in primary culture in comparison with their in vivo counterparts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 2017.
- HERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Comparison of the effects of Percoll and PureSperm_ on the common marmoset (*Callithrix jacchus*) semen. **J Med Primato**, v. 34, p. 86–90, 2005.
- HONDA, A. et al. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 30, p. 12389–12394, 2007.
- IWATA, H. Age-associated changes in granulosa cells and follicular fluid in cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 339–345, 2017.

JAHROMI, B. N. et al. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: A co-culture study. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, n. 3, p. 111–117, 2015.

JIAJIE, T. et al. Conserved miR-10 family represses proliferation and induces apoptosis in ovarian granulosa cells. **Nature Publishing Group**, n. August 2016, p. 1–12, 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica texto e atlas**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KORDUS, R. J.; LAVOIE, H. A. Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. **Reproduction**, v. 153, n. 2, p. R69–R83, 2017.

KRANC, W. et al. Expression Profile of Genes Regulating Steroid Biosynthesis and Metabolism in Human Ovarian Granulosa Cells—A Primary Culture Approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2673, 2017.

LEONI, G. G.; NAITANA, S. **Ovine Granulosa Cells Isolation and Culture to Improve Oocyte Quality**. New York: Humana Press, 2018. v. 1817

LIMA, L. F. et al. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reproducao e Climaterio**, v. 31, n. 2, p. 93–104, 2016.

LIMA, G. R. DE; BARACAT, E. C. **Ginecologia endócrina**. São Paulo: Atheneu, 1995.

MACHADO, L. V. Os ovários: Estrutura Anatômica e Fisiologia; Implicações clínicas das Hipo e Hiperfunções; conduta terapêuticas. **Revista Femina**, v. 32, n. 5, p. 405–413, 2004.

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.

MÁTÉ, G.; BERNSTEIN, L. R.; TÖRÖK, A. L. Endometriosis Is a Cause of Infertility. Does Reactive Oxygen Damage to Gametes and Embryos Play a Key Role in the Pathogenesis of Infertility Caused by Endometriosis? **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. November, p. 1–16, 2018.

MOORE, K.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Básica**. 9ª ed. [s.l.] Elsevier, 2016.

NAKAMURAS, T.; SUGINOS, K.; TITANISQ, K. Follistatin , an Activin-binding Protein , Associates with Heparan Sulfate Chains of Proteoglycans on Follicular Granulosa Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 29, p. 19432–19437, 1991.

NAVAKANITWORAKUL, R. et al. Characterization and Small RNA Content of Extracellular Vesicles in Follicular Fluid of Developing Bovine Antral Follicles. 2016.

OTERO, R. A.; COSTA, E. P. DA; PEREIRA, E. M. Maturação nuclear in vitro de ovócitos bovinos selecionados pelo método azul cresil brilhante In vitro nuclear maturation of bovine oocytes selected by the brilliant cresyl. **Revista Colombiana de Ciência Animal**, v. 9, n. Supl 2, p. 345–354, 2017.

PAKSY, K. et al. Lead accumulation in human ovarian follicular fluid , and in vitro effect of lead on progesterone production by cultured human ovarian granulosa cells. **Jornal of Toxicology and Environmental Health**, v. 62, n. 5, p. 359–366, 2001.

PEREGO, M. C. et al. Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function : glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro. **Applied Toxicology**, v. 37, n. October 2016, p. 692–698, 2017.

PEREIRA, R. M. et al. INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO MECÂNICA E DA HIALURONIDASE NO TRATAMENTO DE OÓCITOS BOVINOS APÓS A INSEMINAÇÃO IN VITRO SOBRE A CLIVAGEM E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES. 1º **Congresso Ibérico de Reprodução Animal**, v. 2, n. Julho, p. 150–154, 1997.

PORTELA, V. M.; ZAMBERLAM, G.; PRICE, C. A. Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 6, p. 2050–2055, abr. 2010.

QUINN, M. C. J. et al. Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 5, p. 501–508, 2006.

ROJAS, J. et al. Physiologic Course of Female Reproductive Function: A Molecular Look into the Prologue of Life. **Journal of Pregnancy**, v. 2015, 2015.

ROSSETTO, R. et al. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2011.

SANCHES, L. **Efeitos do fator de crescimento dos fibroblastos 8 (FGF8) na maturação in vitro de complexos cumulus-oócito bovinos.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2016.

SERAKIDES, R. et al. Foliculogênese e Esteroidogênese Ovarianas em Ratas Adultas Hipertireóideas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 3, p. 258–264, 2001.

SINDEREWICZ, E. et al. Expression of factors involved in apoptosis and cell survival is correlated with enzymes synthesizing lysophosphatidic acid and its receptors in granulosa cells originating from different types of bovine ovarian follicles.

Reproductive Biology and Endocrinology, v. 15, n. 72, 2017.

SUN, L. et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin- induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. **Nature**, v. 7, n. 2552, 2017.

VILELA, J. DE M. V. **Cultivo in vitro e em membrana corioalantoica e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas.** [s.l.] Universidade de Brasília, 2016.

VIRANT-KLUN, I. et al. Human oocyte maturation in vitro is improved by co-culture with cumulus cells from mature oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, 2018.

VIREQUE, A. A. et al. Cultura de células da granulosa humanas com fenótipo de fase folicular: Influência do sistema quimicamente definidona morfologia, ultraestrutura, secreção de esteroides e relaxina. **Reproducao e Climaterio**, v. 28, n. 3, p. 92–103, 2013.

WANG, Q. et al. Mumps virus induces innate immune responses in mouse ovarian granulosa cells through the activation of Toll-like receptor 2 and retinoic acid-inducible gene I. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 436, n. 2016, p. 183–194, 2016.

WEI, M. et al. Astragalín, a flavonoid from *Morus alba* (mulberry) increases endogenous estrogen and progesterone by inhibiting ovarian granulosa cell

apoptosis in an aged rat model of menopause. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

WINTERHAGER, E.; KIDDER, G. M. GAP junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 3, p. 340–352, 2015.

XIE, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes human granulosa-like tumor cell steroidogenesis and proliferation by activating the FSH receptor-mediated signaling pathway. **Scientific Reports**, n. November 2016, p. 1–13, 2017.

XU, X. et al. Molecular signature in human cumulus cells related to embryonic developmental potential. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 2, p. 173–180, 4 fev. 2014.

YADAV, M. et al. Three-dimensional culture of buffalo granulosa cells in hanging drop mimics the preovulatory follicle stage. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 3, p. 1959–1970, 1 mar. 2018.

ANEXO 1 – TABELA COMPARATIVA DOS PROTOCOLOS

Protocolo	Esquema
Protocolo 1	Tripsina 0,15%
Protocolo 2	Tripsina 0,15% + Filtro para células 70 µm
Protocolo 3	Tripsina 0,15% + Filtro para célula 70 µm + Tampão para lise de hemácias (ACK)
Protocolo 4	Células transportadas no PBS e no FF + Tripsina 0,15% + Filtro para célula 70 µm + Tampão para lise de hemácias (ACK)
Protocolo 5	Hialuronidase + ACK + Percoll
Protocolo 6	Hialuronidase + ACK