UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARINA MEIRELLES MACHADO

**Padronização da metodologia de congelamento de células da
granulosa antrais humanas para suporte no co-cultivo com oócitos
imaturos**

RIBEIRÃO PRETO
2016

MARINA MEIRELLES MACHADO

**Padronização da metodologia de congelamento de células da
granulosa antrais humanas para suporte no co-cultivo com oócitos
imaturos**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em cumprimento dos requisitos para o grau de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia
Opção: Biologia da Reprodução

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

**RIBEIRÃO PRETO
2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Machado, Marina Meirelles

Padronização da metodologia de congelamento de células da granulosa antrais humanas para suporte no co-cultivo com oócitos imaturos, 2016.

93p.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Rosa-e-Silva, Ana Carolina Japur de Sá

1. Células da granulosa. 2. Criopreservação 3. Maturação *in vitro* 4. Viabilidade. 5. Congelamento lento. 6. Co-cultivo.

Dedicatória

À minhamãe **Denise**, que muitas vezes sozinha ensinou a mim e aos meus irmãos
a sermos independentes e correr atrás dos nossos objetivos.

Guerreira, exemplo de força e amor.

Aos meus irmãos **Marcela e Felipe**, que me ensinaram o amor incondicional.

Ao meu esposo, **Augusto**, metade que me completa, que sempre me incentivou a
nunca desistir.

Agradecimientos

Agradeço à Deus que sempre me deu força e coragem para continuar seguindo meus objetivos, apesar das adversidades encontradas nesta trajetória.

A todos os meus familiares e agregados que sempre estiveram ao meu lado dispostos a oferecer todo amor, amizade, carinho e conforto.

A todos que compõem o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (docentes, médicos contratados, pesquisadores, técnicos e secretários), pela contribuição na minha formação profissional.

À amiga Jacira Campos, uma excelente pesquisadora e companheira nas inúmeras tentativas e testes do cultivo da granulosa, trazendo sempre um sorriso e uma música alegre para o laboratório.

A banca examinadora, pela disponibilidade em participar deste momento importante do meu desenvolvimento profissional.

A todos que trabalham no Setor de Reprodução Humana e aos funcionários do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, agradeço as oportunidades proporcionadas ao meu crescimento profissional.

Agradeço em especial à Albina e Tati pela paciência com as minhas dosagens, à Cidinha, Marilda, Sandra, Auxiliadora e Marisa por me aguentarem correndo atrás dos prontuários e a todo momento fazendo perguntas, à Cris Picinato, Roberta e Camila por estarem de prontidão para me trazer as minhas amostras ou fotografá-las quando necessário. E Cris Padovan por tornar meus dias mais alegres.

Às pacientes que participaram deste estudo como voluntárias, pela colaboração.

Aos amigos da Pós-graduação pela convivência diária e sempre divertida, pelo companheirismo e pela troca de aprendizado e favores durante esse período de especialização.

Ao CNPq e FAEPA pelo apoio financeiro imprescindível na realização desta pesquisa.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

Epígrafe

"A ciência sem a religião é manca, a religião sem a ciência é cega."

Albert Einstein

Resumo

Padronização da metodologia de congelamento de células da granulosa antrais humanas para suporte no co-cultivo com oócitos imaturos.

As técnicas de cultivo de folículos e oócitos *in vitro*, com o objetivo de se obter oócitos maduros para procedimentos de Reprodução Assistida (RA), têm sido aplicadas em diferentes contextos. O sucesso destes procedimentos está diretamente relacionado ao sistema de cultivo utilizado. A utilização de células da granulosa (CG) humanas cultivadas *in vitro* como um suporte para o co-cultivo destes oócitos imaturos e folículos tem sido descrita por alguns autores. A criopreservação destas células, considerando-se o contexto de sua obtenção em procedimentos de RA, permitiria a viabilização da aplicação destas células na prática clínica diária. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi padronizar o congelamento de células da granulosa (CG) humanas para aplicação em sistemas de co-cultivos de folículos e oócitos imaturos. Foram obtidas CG de 20 voluntárias em tratamento de reprodução assistida, células de 10 voluntárias foram cultivadas em meio α -MEM suplementado para interrupção da luteinização e congeladas após 48 horas em container “Cryostep” (grupo 2C- 2 cultivos) (etapa 2) e células de 10 voluntárias foram congeladas em container “Cryostep” sem cultivo prévio (grupo CD- congelamento direto) (etapa 3). Após o descongelamento estas células foram (re)cultivadas por 144 horas, com troca de meio em 48, 96 e 144 horas para avaliações da produção de estradiol (E2) e progesterona (P4) (ng/mL). Verificamos redução na contagem celular e na viabilidade celular tanto no método de congelamento direto (CD) quanto no método com dois cultivos (2C) após o descongelamento ($p < 0,05$), e isso se refletiu na produção de estradiol e progesterona que foi maior nas culturas de células frescas em relação às células criopreservadas ($p < 0,05$). Porém, a relação de E2/célula foi mantida após o descongelamento, sugerindo que esta redução na produção se deve à redução no número de células, as que sobrevivem se mantêm normofuncionantes ($p = 0,23$). O CD foi mais eficiente pois permitiu uma maior recuperação celular e uma melhor viabilidade quando comparado ao grupo 2C. A relação estradiol/progesterona foi mantida em todos os tempos de cultivo, fresco, CD e 2C ($p > 0,05$), indicando que a característica funcional destas células foi preservada após o descongelamento. Concluímos que a criopreservação de CG humanas obtidas durante a captação de oócitos compromete a contagem celular e a viabilidade geral da cultura, entretanto, a capacidade funcional e a característica destas células se mantêm preservadas (manutenção das relações E2/célula e E2/P4).

Palavras-chave: Células da granulosa, criopreservação, maturação oocitária, viabilidade, congelamento lento, co-cultivo, maturação folicular.

Abstract

Cryopreservation of human granulosa cells for future use in assisted reproductive procedures

Follicle and oocyte in vitro culture techniques, aiming to obtain mature oocytes for Assisted Reproductive Treatments (ART), have been applied to different contexts. The success of these procedures depends on the culture system used. The use of human granulosa cells (GC) in co-culture systems for follicle and oocyte maturation have been described by some authors. The cryopreservation of these cells, considering the context in which they are obtained during ART, would enable the usage of these cells in such procedures in daily clinical practice. Thus, the objective of this study was to standardize the freezing protocol for human granulosa cells (GC) for future applications in co-culture systems for follicle and oocyte maturation. Twenty volunteers submitted to ART donated their granulosa cells after oocyte retrieval, 10 were cultivated previously in order to interrupt the luteinization process and then frozen "Cryostep" container (group 2C- two cultures) (step 2) and 10 were directly frozen with no previous culture in the "Cryostep" container (group DF- direct freeze) (step 3). After thawing these cells were (re)cultured for 144 hours, with medium exchange at 48, 96 and 144 hours to evaluate the estradiol (E2) and progesterone (P4) production (ng/mL). After thawing, there was a reduction in the cell number ($p<0,05$) and cell viability in both methods, the direct freezing (DF) and the two cultures (2C) ($p<0,05$); this had an impact in the production of estradiol and progesterone, which were higher in fresh cultures than in the frozen ones ($p<0,05$). However, the E2/cell ratio was maintained after thawing ($p=0.23$), suggesting that this impairment in steroid production was probably due to the reduction in the cell count. The cells that survive remain functionally normal. The DF was more efficient since it allowed greater cell recovery and better viability when compared to 2C. The estradiol/progesterone ratio was maintained in all culture times, in the fresh, DF or 2C groups ($p>0.05$), indicating that the functional characteristic of these cells was preserved post-thawing. We conclude that cryopreservation of human GC obtained during oocyte retrieval compromises the cell count and the overall viability of the culture; however, the functional capacity and the characteristic of these cells are preserved (maintenance of E2/cell and E2/P4 relations).

Key words: Granulosa cells, cryopreservation, oocyte maturation, viability, slow-freezing follicular maturation, co-culture.

Lista de Abreviaturas

2C: dois cultivos ou duplo cultivo
CD: congelamento direto
CSFB: congelamento com soro fetal bovino
CSSS: congelamento com soro sintético substitutivo
CEP: comitê de ética em pesquisa
CG: células da granulosa
DMSO: dimetil-sulfóxido
E2: 17 β -estradiol
EG: etilenoglicol
EGF-L: fator de crescimento epidermal dependente de LH
E/P: relação estradiol- progesterona
FIV: fertilização *in vitro*
FSH: hormônio folículo estimulante
GnRHa: agonista do hormônio liberador das gonadotrofinas
HC-FMRP/USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
hCG: gonadotrofina coriônica humana
IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1
LH: hormônio luteinizante
MIV: maturação *in vitro*
P4: progesterona
PBS: tampão de salina com fosfato
PROH: 1-2-Propanediol
PVP: polivinilpirrolidona
RA: reprodução assistida
SFB: soro fetal bovino
SSS: soro sintético substitutivo
TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido
 α -MEM: meio mínimo essencial

Lista de Figuras

Figura 1. Desenho do estudo	34
Figura 2. Ilustração do congelamento lento - Cryostep e curva de congelamento.....	39
Figura 3. Imagens dos cultivos fotografados na lupa nos diferentes tempos- fresco, 2C e CD.	44
Figura 4. Imagens dos cultivos fotografados no microscópio invertido- fresco e CD.	45
Figura 5. Curvas de produção hormonal de estradiol e progesterona nos diferentes tempos do cultivo.....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1. Viabilidade e produção de estradiol e progesterona utilizando SFB e SSS no meio de criopreservação.....	42
--	----

Tabela 2. Concentração e viabilidade celular dos cultivos fresco, CD e 2C.	46
--	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Introdução	23
1.2. Células da Granulosa	25
1.3. Congelamento lento	27
2. OBJETIVO	29
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. Aspectos éticos	32
3.2. Desenho do Estudo	32
3.3. Recrutamento das pacientes	35
3.4. Tratamento das pacientes voluntárias	36
3.5. Recuperação das Células da Granulosa dos aspirados foliculares	36
3.6. Cultura das células da granulosa Protocolo Original com 2 cultivos (2C)	37
3.7. Dosagens hormonais	37
3.8. Congelamento convencional lento- Protocolo Original com soro feral bovino (2C-SFB)	38
3.9. Protocolo de Congelamento Modificado sem cultivo prévio (Congelamento Direto - CD)	39
3.10. Viabilidade Celular	39
3.11. Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Etapa 1:Determinando o melhor protocolo de congelamento (CSFB x CSSS)	42
4.2. Etapas 2 e 3: Análise do Impacto do congelamento sobre as células - Protocolo de Congelamento Original (CSFB)	43
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS	57
ANEXO	62
ARTIGO CIENTÍFICO	65

1. Introdução

1.1. Introdução

É amplamente aceito que as mulheres já nascem com uma fonte finita de oócitos, que diminui com a idade e se esgota na menopausa (Faddy et al., 1992; Wallace & Kelsey, 2010). Esse declínio natural da fertilidade é dramaticamente acelerado por tratamentos como a quimioterapia e a radioterapia. Tais tratamentos destroem várias células no corpo, inclusive as células ovarianas, deixando jovens mulheres diagnosticadas com câncer com graves sequelas sobre a função reprodutiva que vão desde a subfertilidade até a falência prematura dos ovários, com todas as repercussões ligadas à menopausa (Oktay & Sonmezer, 2008; Schmidt et al., 2010). Neste contexto, surge a preocupação com a preservação de fertilidade de pacientes oncológicas que não tem ainda prole constituída e que serão submetidas a tratamento potencialmente esterilizante.

Dentre as técnicas de criopreservação encontram-se a criopreservação de embriões e oócitos com posterior transferência desses embriões, as quais são bem estabelecidas e usadas rotineiramente em clínicas de fertilização assistida, porém a maioria dessas técnicas nem sempre podem ser aplicadas a todas estas pacientes, particularmente as pré-púberes, aquelas que necessitam de tratamento imediato contra o câncer ou que possuem câncer estrogênio dependente tendo contra indicação ao uso de medicações hormonais, como os indutores de ovulação. Como alternativa para estes casos, a criopreservação de tecido ovariano dispensa a indução prévia da ovulação e garante a preservação de grande número de gametas.

A criopreservação de tecido implica na retirada cirúrgica e congelamento dos ovários ou fragmentos do mesmo antes do início do tratamento gonadotóxico, representando assim uma esperança de fertilidade futura. Embora até o momento esta técnica seja ainda considerada experimental (Lee et al., 2006), dados recentemente reportados trazem taxas de nascidos vivos a partir de tecido ovariano reimplantado em torno de 30%, sendo que já 35 casos de sucesso de nascidos vivos reportados (Stoop et al., 2014) e 121 casos de reimplante deste tecido, com reestabelecimento da função esteroidogênica ovariana próxima a 100% (Stoop et al., 2014). Considera-se, porém, que o reimplante deste tecido é arriscado, a depender da doença oncológica de base, podendo ocorrer a reinserção de células malignas possíveis causadoras de recorrência do

câncer nestas pacientes, uma vez que o mesmo não foi tratado pelo quimioterápico (Rosendahl et al., 2010). Novas alternativas para a aplicação do tecido criopreservado vem sendo estudadas. Uma delas é a extração de folículos imaturos a partir do tecido, os quais poderão ser maturados *in vitro* para posterior procedimento de reprodução assistida (RA). Na prática, os resultados dos procedimentos de maturação de folículos em humanos são ainda insatisfatórios, porém protocolos de cultivo de folículos secundários em outras espécies já obtiveram nascidos vivos, e prole fértil (Xu et al, 2006).

Vários protocolos envolvendo diferentes suplementações dos meios de maturação *in vitro* tanto para folículos como para oócitos imaturos, estão sendo testados em centenas de laboratórios com o objetivo de obter oócitos capacitados para fecundação. O cultivo folicular deve ser feito preferencialmente em meio tridimensional para que não haja perda dos limites foliculares e aderência deste ao plástico da placa, mesmo porque o ideal é que tudo seja feito o mais próximo do que ocorre *in vivo* (Tagler et al., 2012). Outro aspecto muito importante do sistema *in vitro* para o crescimento de folículos pré-antrais é a composição do meio de cultivo (Smitz & Cortvrindt, 2002). Várias substâncias adicionadas podem influenciar a sobrevivência e o crescimento folicular, incluindo antibióticos, tampões, substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, monossacarídeos, etc.), diferentes fontes proteicas, antioxidantes, hormônios e diversos fatores de crescimento (Figueiredo et al., 2008). Entretanto, um sistema que suporte todo o desenvolvimento folicular desde o estágio primordial até um estágio de oócito em metáfase II (maduro e fertilizável) ainda não foi alcançado até o momento em nenhum dos modelos de estudo mais conhecidos, tais como animais domésticos, bovinos e primatas não humanos, tampouco em humanos.

No processo de foliculogênese ocorre intensa troca de substâncias entre o oócito e as células somáticas da parede folicular (granulosa e teca), em um mecanismo conhecido como “cross-talk” e as substâncias envolvidas neste processo são inúmeras e muitas ainda desconhecidas, o que torna o processo complexo e ainda muito pouco elucidado. Na tentativa de mimetizar ao máximo o ambiente intraovariano para que ocorra o desencadeamento da foliculogênese nos seus estágios iniciais, acreditamos que se possa utilizar o cultivo destes

folículos na presença de células da granulosa obtidas durante o procedimento de RA, supondo que a secreção de algumas substâncias fundamentais pelas CG possa ser importante para a obtenção de oócitos maduros e competentes do ponto de vista reprodutivo.

O uso de células somáticas suplementando a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos durante a fertilização *in vitro* (FIV) normalmente tem como objetivo obter um grande número de embriões viáveis e saudáveis com alto potencial de implantação. Entre as diferentes linhagens de células que podem ser utilizadas na co-cultura encontram-se as células da granulosa. Existem evidências de que a suplementação do meio de MIV com células da granulosa melhora a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos em bovinos (Maeda et al., 1996), ovelhas (Staigmiller & Moor, 1984), cabras (Teotia et al., 2001), camelos (Khatir et al., 2004), cães (Abdel-Ghani et al., 2012) e macacos (Schramm & Bavister, 1995), como também a incidência de fertilização normal (Mochizuki et al., 1991). Li e colaboradores (2011) comprovaram a eficiência do co-cultivo de oócitos imaturos murinos com células da granulosa pré-antrais. Os resultados mostraram que os oócitos cultivados na presença das CG durante sete dias cresceram mais rapidamente e que 14,6% dos oócitos foram capazes de completar sua divisão meiótica e alcançaram o estágio de Metáfase II (MII), bem como houve uma melhora nas taxas de fertilização e formação de blastocistos. A porcentagem de oócitos apoptóticos após o cultivo, com ou sem CG, foram de 33,5 e 51,5%, respectivamente (Li et al., 2011). Assim considera-se que as células da granulosa encontradas *in vivo* nos folículos em desenvolvimento, sem dúvida alguma, tem um papel importante no processo de maturação oocitária.

1.2. Células da Granulosa

As células da granulosa humana são autólogas, seguras, de fácil obtenção, apresentam-se em fracos agregados e tem aparência irregularmente arredondada ou formato poliédrico, variando em diâmetro de 18 a 25µm (Notolla et al., 2006). A comunicação entre as células da granulosa e o oócito (“*cross-talk*”), essencial para a foliculogênese, o crescimento e maturação oocitária (Gilchrist et al., 2004), se dá por meio de uma rede extensiva de canais transmembrana conhecidos como junções gap. As funções fisiológicas das junções gap no folículo são diversas, fornecendo suporte nutricional, transmitindo sinais elétricos e transportando moléculas

mensageiras das células foliculares ao oócito. Estas moléculas mensageiras podem passar através das junções gap para as células vizinhas, propagando sinais induzidos por estimulação hormonal (Ancioto et al. 2004). Os benefícios da presença dessas células durante a maturação *in vitro* podem ser atribuídos à formação de um microambiente favorável (bioquímico e metabólico) ao redor do oócito (Sutton et al., 2003), e o uso destas células na MIV de folículos possivelmente aumentariam as chances de se atingir o estágio de maturação necessário para procedimentos de fertilização assistida. Sabe-se que a diferenciação final do oócito é orquestrada por uma rede de fatores de crescimento e citocinas que levam a maturação nuclear e citoplasmática.

Pensando na alternativa da maturação *in vitro* de folículos humanos utilizando-se células da granulosa para dar suporte nutricional aos mesmos (co-cultivo), simulando o estado fisiológico do microambiente intra-ovariano, o ideal seria fazê-lo num sistema de cultivo cuja produção hormonal fosse predominantemente estrogênica, mantendo assim um perfil favorável para a fase folicular. Entretanto os sistemas de cultura de células da granulosa desenvolvidos nas últimas duas décadas têm sido caracterizados por um consistente declínio na produção de estradiol no decorrer do tempo de cultura enquanto a síntese de progesterona (P4) aumenta, sugerindo início de luteinização. Esta característica é observada, pois as células cultivadas são obtidas durante procedimentos de RA, a partir de folículos onde a maturação já foi induzida artificialmente pela administração de hCG ou LH 34 a 36 horas antes da punção. As células da granulosa sofrem profundas alterações bioquímicas e mudanças morfológicas ao longo do desenvolvimento folicular devido à complexa dinâmica do folículo. O processo de luteinização é caracterizado pela mudança no perfil secretório das CG, que passa de estradiol para progesterona como consequência da perda da aromatização (Hillier et al., 1994).

Porém, no estudo de Vireque e colaboradores (2014), foi demonstrada a interrupção, ao menos parcial, do processo de luteinização dessas células e neste meio o cultivo das mesmas pode ser mantido por pelo menos 144 horas conservando características de fase folicular (Vireque et al., 2014; Campos et al., 2014). O meio de cultivo de granulosa utilizado foi o meio α -MEM; que é um sistema livre de soro, o qual foi suplementado com FSH, insulina, androstenediona, IGF-1, selênio, todos com papel bem definido sobre o desenvolvimento da cultura. Neste estudo houve redução da produção de

progesterona em relação ao cultivo padrão e manutenção da secreção de estradiol (E2) ao longo do cultivo indicando que a enzima aromatase continuava ativa.

Portanto, a utilização de células da granulosa cultivadas *in vitro* como suporte para co-cultivo de folículos imaturos, parece ser possível desde que os estágios de desenvolvimento estejam sincronizados, ou seja, que as células de granulosa mantenham as características de fase folicular inicial.

1.3. Congelamento lento

A criopreservação já tem um papel muito importante e crescente na medicina reprodutiva. O objetivo da criobiologia é evitar preservar a viabilidade das células e tecidos em temperaturas ultrabaixas. Para conseguir isso, é necessário eliminar as duas principais causas de morte celular: a formação de cristais de gelo no interior das células (Mazur, 1963) e as concentrações letais de solutos (Kleinhans & Mazur, 2007), mantendo a capacidade funcional das organelas intracelulares (Edgar & Gook, 2012). As técnicas de criobiologia tem como princípio a desidratação e esta depende da permeabilidade celular à água (permeabilidade hidráulica), o que pode variar de acordo com os tipos celulares (Edgar & Gook, 2012).

Para diminuir os danos teciduais e celulares secundários ao congelamento é necessária a utilização de crioprotetores (Kim et al., 2001), que são agentes com alta solubilidade em água e baixa toxicidade, que impedem a formação de cristais de gelo no interior das células submetidas ao processo. Os mais amplamente usados são o dimetilsulfóxido (DMSO), o 1,2-propanediol (PROH), o etilenoglicol (EG), o glicerol e a sacarose (Arnon et al., 2001). Apesar da função imprescindível dos crioprotetores, tais substâncias possuem alguma toxicidade e a minimização deste efeito tóxico pode ser conseguida pela redução do tempo de exposição aos mesmos, uma vez que eles têm capacidade de rápida penetração a temperaturas bastante baixas (Kim et al., 2001). O congelamento lento tem a vantagem do uso de baixas concentrações de crioprotetores, o que supostamente minimiza o efeito tóxico. De qualquer maneira é importante enfatizar que a sobrevivência das células é necessária, mas que não é garantia de sucesso, uma vez que a

viabilidade não necessariamente representa manutenção da função fisiológica normal (Edgar & Gook, 2012).

Vários são os materiais biológicos que podem ser submetidos ao processo de criopreservação para finalidades diversas. Tirelli e colaboradores (2005) realizaram um estudo com células da granulosa de porcas submetidas a congelamento lento onde se constatou que as células recultivadas após o congelamento apresentaram aumento significativo de estrogênios basais onde foi feita adição de FSH ao meio crioprotetor, indicando manutenção do potencial de esteroidogênese destas células. Os autores também demonstraram que o congelamento não compromete a proliferação e a viabilidade das células da granulosa de porcas submetidas ao processo de criopreservação independentemente da suplementação do meio com FSH. Além disso, houve um aumento da apoptose das células submetidas a criopreservação, bem como um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, indicando que o congelamento também promove algum grau de estresse oxidativo (Tirelli et al., 2005).

No caso do congelamento de células da granulosa, para utilizá-las como suporte nos cultivos de folículos e oócitos imaturos, objetiva-se facilitar a obtenção de amostras para co-cultivo, as quais poderão ser armazenadas na forma de alíquotas prontas para serem descongeladas e utilizadas no cultivo dos folículos, sem que haja necessidade de sincronizar a captação de oócitos de pacientes de RA para a coleta das células com o início da maturação *in vitro* de outra paciente. Além disso, é possível estocar essas amostras na forma de banco para um período de quarentena após o qual as mesmas poderão ser retestadas para garantir a ausência de contaminação. Ou seja, tem-se em vista a otimização e a segurança dos processos de co-cultivo de folículos e oócitos imaturos aplicados na rotina da prática assistencial.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo implementar a técnica de criopreservação de células de granulosa humana obtidas em procedimentos de Reprodução Assistida para posterior aplicação como suporte para co-cultivo de folículos e oócitos imaturos. E avaliar o impacto da criopreservação na viabilidade e função das células da granulosa.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar se a técnica de congelamento lento de acordo com o protocolo descrito por Tirelli et. al. (2005) se aplica para criopreservação de granulosa humana.
- Avaliar o impacto da criopreservação de células da granulosa humana sobre a viabilidade celular através da semeadura e cultivo de células descongeladas e análise por técnica de Azul de Tripán após 144 horas.
- Avaliar o impacto da criopreservação de células da granulosa humana sobre a função celular através da semeadura e cultivo de células descongeladas e posterior dosagem de hormônios esteroides (estradiol e progesterona) produzidos no meio de cultivo por técnica de quimioluminescência e avaliação morfológica das colônias celulares formadas.

3. Metodologia

3.1. Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e em seguida submetido ao comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) (CAAE: CAAE: 10860912.0.0000.5440. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) deste projeto (anexo1).

3.2. Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo experimental em células da granulosa humanas. Este estudo foi dividido em 3 etapas:

- Etapa 1: No protocolo original de Tirelli (2005), o meio de congelamento prevê a suplementação com soro fetal bovino (SFB). No protocolo definido para o desenvolvimento de células da granulosa com características de fase folicular desenvolvido em nosso laboratório (Campos et al. 2014- dados submetidos à publicação) e (Vireque et al, 2015) há necessidade de meio livre de soro para que não ocorra o processo de luteinização nas células cultivadas. Desta maneira, preocupados com a interferência do meio de criopreservação na característica das colônias optamos por comparar o protocolo com SFB (Tirelli et al, 2005) com o suplementado somente com SSS (soro sintético substitutivo), a fim de verificar o impacto sobre as células cultivadas em termos de atividade esteroidogênica. (Figura 1)
- Etapa 2 ou experimento 2C (2 cultivos): Definido o uso do protocolo de criopreservação contendo SFB foram iniciados os testes para o congelamento das células de granulosa já cultivadas (com características definidas de fase folicular no pós cultivo), comparando-se as características morfofuncionais das células em cultivo, antes e após o congelamento lento. (Figura 1)
- Etapa 3 ou experimento CD (congelamento direto): Verificado, a partir do experimento 2, haver grande comprometimento da recuperação de células após o congelamento e lavagem, porém com características de viabilidade e funcionalidade preservadas, optou-se pelo

congelamento prévio ao cultivo, sendo este último realizado somente após o descongelamento das mesmas. (Figura 1)

Figura 1. Desenho do estudo

Legenda: E2- estradiol; P4- progesterona; CD- congelamento direto; 2C- 2 cultivos; CSSS- congelamento com soro sintético substitutivo; CFSB- congelamento com soro fetal bovino.

3.3. Recrutamento das pacientes

As CG humanas foram obtidas de aspirados de fluido folicular destinados ao descarte, resultantes da captação de oócitos em ciclos de RA de pacientes tratadas no serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). CG de 10 voluntárias foram cultivadas para dosagem da produção de E2 e P4 durante as 48, 96 e 144 horas de cultivo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição. As pacientes voluntárias que preencheram os critérios de inclusão e manifestaram o desejo de participar do projeto assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1) e puderam participar desta pesquisa.

Critérios de inclusão:

- idade entre 18 e 40 anos;
- apresentarem ciclos ovulatórios e FSH menor que 12 mIU/mL;
- ter indicação de reprodução assistida por fator de infertilidade masculino ou tubário;
- apresentarem ao mínimo 8 folículos maiores que 14 mm no momento da indicação para a captação;
- concordância em assinar o TCLE.

Critérios de exclusão:

- presença de endocrinopatias como hiperplasia adrenal congênita, hiperprolactinemia, doenças tireoidianas, ainda que compensadas;
- pacientes com endometriose ou com falhas de fertilização em ciclos anteriores;
- uso de medicamentos como tratamento com glicocorticóides ou antiandrogênios por um período mínimo de 60 dias antecedentes ao início da indução.

3.4. Tratamento das pacientes voluntárias

As pacientes receberam anticoncepcional oral de baixa dosagem (Etinilestradiol 20 + Gestodeno 75), iniciado entre o 1º e o 5º dia do ciclo precedente ao ciclo de indução e até 5 dias antes da data programada para iniciar a indução com gonadotrofina.

O bloqueio hipofisário foi realizado com análogo agonista do Hormônio Liberador das Gonadotrofinas (GnRHa), Acetato de Cetrorrelax ®- Merck- 0,25mg/dose com dose única diária quando 01 ou mais folículos atingem 14mm e mantida até o dia da administração da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG).

No dia programado para o início da indução da ovulação, a paciente foi submetida a exame de ultrassonografia com a finalidade de avaliar os ovários e anatomia uterina. Para a indução foi administrado FSH recombinante (Gonal® – Laboratório SERONO ou Puregon® – Laboratório ORGANON) em doses variáveis, de acordo com a resposta da paciente, por via subcutânea (sc) sempre às 18 horas. O ajuste de dose foi feito com base no recrutamento e crescimento folicular acompanhado pela ultrassonografia transvaginal seriada. Na presença de pelo menos dois folículos com diâmetro superior a 17 milímetros (mm), foi administrado hCG recombinante (Ovidrel®- SERONO) na dose de 250µg às 22 horas. Após um intervalo de 34 a 36 horas, foi realizada a captação dos oócitos.

Os folículos foram punccionados e os aspirados de fluido folicular com as CG que normalmente seriam descartados, foram encaminhados imediatamente para os procedimentos preparatórios para o cultivo celular.

3.5. Recuperação das Células da Granulosa dos aspirados foliculares

Após identificação e retirada dos oócitos, os fluidos foliculares contendo as CG e que seriam desprezados, foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL contendo aproximadamente 5 mL de PBS acrescido de antibiótico/antimicótico e encaminhados ao Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia. Os fluidos foliculares com presença de sangue foram vertidos para uma ou duas placas de Petri de 60 mm e após sedimentação das células sanguíneas os grumos de CG foram recuperados rapidamente. Esses grumos foram transferidos para placa de

Petri de 35 mm contendo 2 mL de PBS acrescido de antibiótico/antimicótico mantido em gelo para serem lavados. As CG foram transferidas para tubos cônicos e imediatamente centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após essa centrifugação, foi acrescentado ao pellet 1 mL de meio α -MEM para montar o gradiente de Histopaque 1077 (1:2), com a finalidade de separar as células sanguíneas que ainda permaneceram no pellet de CG. O gradiente foi centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos a 4°C. A camada de CG visível na interface foi isolada lentamente por pipetagem, lavada em 2 mL de PBS e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, 100 μ L de meio α -MEM previamente equilibrado em incubadora de CO₂ foi acrescentado ao pellet.

Foi retirada a amostra da suspensão celular para determinação da concentração e o número de células viáveis, segundo método de exclusão do Azul de Tripán. Para a contagem em Câmara de Neubauer foi preparado 10 μ L de suspensão celular acrescida de 90 μ L de Azul de Tripán a 0.4% diluído em PBS. O número total de células e o número de células coradas foram contados. A viabilidade foi estimada dividindo-se o número de células viáveis pelo número total de células e os resultados analisados em porcentagem.

3.6. Cultura das células da granulosa Protocolo Original com 2 cultivos (2C)

As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em meio α -MEM (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY) com bicarbonato de sódio suplementado com Hepes, antibiótico, PVP, androstenediona, FSH, IGF-I, transferrina e selênio (modificado de Campos et al., 2012). Aproximadamente 125.000 células viáveis em meio foram semeadas em cada poço das placas de cultura contendo 1000 μ L de meio de cultura previamente equilibrado. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e mantidas durante 48 horas e em seguida congeladas, o controle foi mantido por 144 horas em cultivo com 70% do meio trocado a cada 48 horas. (Gutiérrez et al., 1997).

3.7. Dosagens hormonais

Os meios de cultura foram retirados a cada 48 horas para as dosagens de estradiol e

progesterona, e foram mantidos a -20°C até a realização da leitura. Ambas as dosagens foram realizadas pelo método de quimioluminescência, que combina anticorpos específicos com enzima amplificada, em um aparelho Immulite 2000- Diagnostic Products Corporation (DPC) sistema randômico automatizado. As análises foram feitas em duplicata, sem extração, e cada esteroide foi analisado em um único ensaio para evitar variação entre-ensaios. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram menores que 15% para o E2 e 10% para P4. As sensibilidades analíticas dos kits de estradiol e de progesterona foram de 15 pg / mL e 0,1 ng / mL, respectivamente. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP.

3.8. Congelamento convencional lento- Protocolo Original com soro feral bovino (2C-SFB)

As células foram retiradas da cultura e colocadas em um tubo para centrifugação sendo um tubo por paciente a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C . As CG foram ressuspensas em criotubo nalgene (Nalgene Company, Rochester, NY, USA) contendo 250 μL de meio de cultura α -MEM suplementado com 50% de soro fetal bovino(Fetal Bovine Serum Gibco®) e foram deixadas no gelo por 20 minutos. Em seguida foram adicionados 250 μL de meio α -MEM contendo 20% DMSO (Dimethyl sulfoxide, SIGMA Aldrich) ao criotubo e deixado no gelo por mais 20 minutos para que ocorresse o equilíbrio do crioprotetor. Logo após, os criotubos foram colocados em um container “Cryostep” da (Nalgene Company) em um freezer -80°C para que ocorresse o congelamento a uma faixa de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Figura 2). Depois de 24 horas, os criotubos foram mergulhados em nitrogênio líquido e estocados até descongelamento.

Para a etapa 1, metade de cada amostra foi criopreservada substituindo-se o SFB por SSS (Serum Substitute Supplement™ (SSS™) Invive Scientific)

Em todos os experimentos realizados, para descongelamento dessas células, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e mergulhados em banho de água a 37°C por 2 minutos, as células foram lavadas duas vezes em 2 mL e 1 mL de meio de cultura α –MEM e centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C para que fosse retirado todo o crioprotetor. Em seguida contadas e plaqueadas (adaptado de Tirelli et al., 2005).

Figura 2: A “Cryostep” (Nalgene Company); B Gráfico representativo da curva de congelamento.

3.9. Protocolo de Congelamento Modificado sem cultivo prévio (Congelamento Direto -CD)

Com a grande perda de células ao longo do processo de preparo para o cultivo e durante o cultivo em si, optamos por testar o congelamento em células não cultivadas previamente (Etapa 3), ou seja, sem induzir a interrupção do processo de luteinização das células. O objetivo foi o de criopreservar um maior número de células em cada procedimento, o que provavelmente otimizaria a recuperação das mesmas células posteriormente e o procedimento como um todo.

As células recuperadas foram criopreservadas sem cultivo prévio utilizando-se o protocolo original de congelamento com SFB descrito no item 3.8 e descongeladas seguindo o mesmo protocolo.

3.10. Viabilidade Celular

Método de exclusão do Azul de Tripán

Após a recuperação de CG de aspirados foliculares, foi retirada amostra da suspensão celular para determinação da concentração e o número de células viáveis, segundo método de exclusão do Azul de Tripán. Onde 10 μ L de suspensão celular foram misturados em 90 μ L de Azul de Tripán a 0.4% diluído em PBS. O corante utilizado foi sempre recém-preparado para cada experimento e o eppendorf com a alíquota mantida em geladeira e gelo. A contagem foi feita em Câmara de Neubauer. O número total de células e o número de células coradas foram contadas. A viabilidade foi estimada da seguinte forma: número de células viáveis / número total de células X 100.

3.11. Análise estatística

Para atingir os objetivos foram realizados modelos lineares de efeitos mistos uma vez que existem medidas ao longo do tempo. Foi checada a distribuição dos resíduos através de gráficos de normalidade e de dispersão entre o resíduo versus o predito. As variáveis E2 no experimento 1 e 3 e a variável E/P no experimento 3 não apresentaram distribuição normal, nesta situação foi realizada uma transformação logarítmica. A análise foi implementada no ProcMixed no programa SAS versão 9.3.

4. Resultados

4.1. Etapa1: Determinando o melhor protocolo de congelamento (CSFB x CSSS)

Do ponto de vista morfológico das culturas, verificou-se que cem por cento das culturas plaqueadas com células à fresco apresentaram formação de clusters, com padrão característico de fase folicular. Após o descongelamento, 11 das 30 amostras cujo material foi adequadamente recuperado para novo plaqueamento (37%) não apresentaram características esperadas após o cultivo, ou seja, as células não se agruparam na forma de clusters. Em todos estes casos não houve a formação de clusters nem no grupo SSS e nem no SFB. Além disso, a viabilidade das células foi semelhante entre os grupos (Tabela 1).

Na comparação entre o uso de SFB ou SSS na suplementação do meio de criopreservação verificamos que não houve influência destas substâncias no padrão de produção hormonal das colônias. A tabela 1 apresenta as dosagens de estradiol e progesterona nos diferentes tempos de cultivo tanto para as células que foram criopreservadas com o SFB quanto para as células criopreservadas com o SSS.

Tabela 1: Viabilidade e produção de estradiol e progesterona utilizando SFB e SSS no meio de criopreservação.

	CSFB	CSSS	p
	média±sd	média ±sd	
Estradiol (ng/mL)	14,44 ± 15,59	13,48 ± 15,20	0,19
Progesterona (ng/mL)	154,7 ± 177,9	148,3 ± 182,1	0,17
Relação E₂/P₄	0,1 ± 0,06	0,12 ± 0,08	0,08
Viabilidade (%)	23,1 ± 7,56	28,69 ± 19,31	1,0

Sendo assim, optamos por manter o protocolo original de congelamento (adaptado de Tirelli et al., 2005) utilizando o SFB na suplementação do meio de congelamento para as etapas subsequentes.

4.2. Etapas 2 e 3: Análise do Impacto do congelamento sobre as células - Protocolo de Congelamento Original (CSFB)

Morfologia

As CGs humanas submetidas ao congelamento lento, tanto as do experimento 2C quanto as do CD, apresentaram características semelhantes às encontradas no cultivo fresco em relação à morfologia dos clusters em geral. Porém observa-se que o tamanho dos mesmos é ligeiramente reduzido nos cultivos criopreservados. A quantidade de células mortas decantadas é visivelmente maior nos poços de cultivo criopreservado (poço sujo), os clusters formados apresentaram-se mais escuros do que os do cultivo fresco, indicando mais uma vez uma quantidade maior de células mortas (Figuras 3 e 4). Além disso, o desenvolvimento dos clusters ao longo dos tempos de cultivo demonstram uma formação um pouco mais tardia dos mesmos nos cultivos de células descongeladas em relação ao fresco; com 48 horas o cultivo fresco já tem seus clusters bem definidos, enquanto que os cultivos 2C e CD apresentam clusters menores com agrupamento mais evidente na avaliação de 96 horas (Figura 3).

Figura 3. Imagens dos cultivos fotografados na lupa nos diferentes tempos. A- cultivo fresco 48horas; B- cultivo fresco 96 horas; C- cultivo fresco 144 horas; D- 2C 48 horas; E- 2C 96 horas; F- 2C 144 horas; G- CD 48 horas; H- CD 96 horas; I- CD 144 horas.

Legenda: 2C- 2 cultivos; CD- congelamento direto; H- horas.

Figura 4: Cultivo de Células da Granulosa fresco (A,B,C) e criopreservado (D,E,F). A- 48 horas de cultivo; B- 96 horas de cultivo; C- 144 horas; D- 48 horas; E- 96 horas; F- 144 horas.

Ao realizar a contagem de células e analisar a viabilidade celular, verificou-se que o congelamento prejudica ambos os parâmetros, embora o congelamento direto comprometa menos tanto a viabilidade quanto a contagem de células após o descongelamento (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração e viabilidade celular dos cultivos fresco, CD e 2C:

	Fresco	CD	2C	p
	média ± sd	média ± sd	média ± sd	
	N=12	N=10	N=12	
Contagem [CG]/100µL	1.031.600± 665.889^{a,b}	477.200± 258.716^{a,c}	156.833± 194.985^{b,c}	<0,01
Viabilidade %	69,5 ±11,73^{d,e}	39,08±9^{d,f}	23,1±7,56^{e,f}	<0,01
Rel. E2/nº céls.	0,0002148± 0,00008510	0,0002947± 0,0001518	0,0005078± 0,0006554	0,5

Legenda: CD-congelamento direto; 2C-2 cultivos; E2-estradiol;CG-células da granulosa. Letras iguais representam diferenças, com p<0,05.

A produção de E2 e P4 foi significativamente maior nas culturas de células frescas em relação às culturas de células criopreservadas. Ao comparar os diferentes tempos de cada cultivo não houve diferença significativa, indicando produção linear de hormônios sem picos, exceto pela redução na produção de progesterona dos tempos 48 para 96 horas no cultivo fresco e no CD (Figura 5). A relação estradiol/progesterona foi mantida após a criopreservação, independente do tempo de cultivo (p>0,05), indicando que a característica funcional destas células foi preservada após descongelamento (Figura 5).

Ao compararmos a produção hormonal das células do congelamento direto (CD) com o das células cultivadas antes e após o congelamento (2 cultivos- 2C), verificamos que a produção de E2 e P4 foi superior em todos os tempos ao longo do cultivo, sem entretanto, modificar a relação E2/P4, ou seja, a interrupção da luteinização também foi eficiente quando o cultivo foi realizado somente após o congelamento (Figura 5).

Figura 5: Curvas de produção hormonal de E2 e P4 nos tempos 48, 96 e 144 horas das células frescas, 2C e CD.

Legenda: Comparações entre os tempos do mesmo grupo são representadas por letras maiúsculas e diferenças entre grupos são representadas por letras minúsculas. Letras iguais representam diferenças estatísticas. ($p < 0,05$). E2-estradiol; P4- progesterona; 2C- 2 cultivos; CD- congelamento direto.

Ao compararmos a relação entre a produção de estradiol após 144hs de cultivo pelo número de células semeadas por poço, verificamos que a produção de E2 por células foi semelhante entre os grupos fresco, 2C e CD ($p=0,5$) (Tabela 2), indicando que uma vez viável a células recuperada da criopreservação mantém sua capacidade funcional semelhante às células frescas.

5. Discussão

O uso de células da granulosa como suporte em co-cultivos de óocito e embriões tem sido descrito por alguns autores (Feng et al., 2011; Casillas et al. 2014; Yoon et al., 2015; Adeldust et al., 2015; Goovaerts et al., 2011). Entretanto, o uso na prática clínica destas células, especialmente em humanos, demanda a obtenção das mesmas a partir de procedimentos de Reprodução Assistida, que como sabemos, não tem obtenção previsível, ou seja, dependem do ciclo de resposta à indução de ovulação de cada paciente. Isso condiciona o emprego destas células em co-cultivo à sincronia com o ciclo de fertilização *in vitro* da paciente. Sendo assim, o desenvolvimento de técnicas adequadas para a criopreservação destas células para uso futuro viabiliza o seu emprego nos sistemas de cultivo.

Neste estudo desenvolvemos um modelo de criopreservação de células da granulosa humana com resultado satisfatório de manutenção de viabilidade e função celular. Ou seja, verificamos que as células que sobrevivem ao procedimento de criopreservação mantêm seu comportamento e produção hormonal, o que foi evidenciado pela relação da produção de E2/célula. Estes achados também foram descritos por (Sluss et al., 1994), aonde a criopreservação das CGs não comprometeu sua resposta *in vitro* à ação do FSH. Porém, houve perda de grande parte da população de células ao longo das etapas de processamento das amostras, da criopreservação e do cultivo.

As células da granulosa são conhecidas por serem células muito sensíveis que morrem facilmente. O aumento da apoptose das células da granulosa é desencadeado pela queda do FSH durante a maturação folicular, o que é consistente com a queda da produção das gonadotrofinas como causa da atresia folicular (Tsafiriri et al., 1984; Tilly et al., 1992). Por se tratarem de células provenientes de RA, folículos de todos os tamanhos foram puncionados, ou seja, muitas destas células são apoptóticas e quando colocadas em cultivo provavelmente fazem com que a viabilidade do cultivo diminua ao longo do tempo. Com isso o cultivo das CGs nesse estudo durou aproximadamente uma semana.

Na tentativa de minimizar a perda celular secundária ao processamento e cultivo de células antes da criopreservação, optou-se por congelar as células sem cultivo prévio, de maneira que as células recuperadas após a aspiração folicular eram lavadas e submetidas ao protocolo de

criopreservação imediatamente. Verificamos que o número de células recuperadas após o descongelamento foi superior em comparação com amostras cultivadas previamente à crio, e a diferenciação celular no cultivo posterior não foi em nada comprometida pela criopreservação. Portanto, o protocolo de congelamento direto utilizado (CD) demonstrou ser mais eficiente do que o de duplo cultivo (2C), simplesmente por proporcionar maior recuperação de células viáveis, visto que o comportamento hormonal das células nos dois procedimentos foi igual, ou seja, a capacidade funcional e a característica destas células ficaram preservadas (manutenção das relações E2/célula e E2/P4).

Quanto ao impacto da criopreservação sobre células e tecidos está bem documentado na literatura. Vários estudos tem demonstrado perda parcial da viabilidade de tecidos (Campos et al., 2011a; David et al., 2012; Donnez et al., 2006; Ting et al., 2011), gametas (Cobo et al., 2013; Sharma et al., 2015; Woodruff&Barrett, 2010)), embriões (Kuwayama 2007) e folículos (Campos et al., 2011b; Demirci et al., 2001;) quando submetidos às diferentes técnicas de congelamento. A criopreservação pode ser feita de várias formas, mas principalmente visa manter a viabilidade celular através do uso de crioprotetores que substituem a água do interior das células e previnem a formação de cristais de gelo no interior das mesmas. Entretanto é um procedimento tóxico onde eventualmente uma grande quantidade de células não sobrevivem. (Edgar & Gook, 2012; Arnon et al., 2001). Embora sejam utilizados crioprotetores para minimizar o impacto do intenso resfriamento sobre as células, ainda assim há um dano. Neste estudo, foi utilizado o DMSO como crioprotetor, seguindo protocolo descrito por Tirelli e colaboradores (2005) para congelamento de células da granulosa de suínos. (Tirelli et al., 2005) O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente barato, comum e de baixa toxicidade. É também uma molécula pequena e versátil devido ao seu papel na síntese orgânica, encontra-se no estado líquido sobre uma vasta gama de temperaturas, é um doador de elétrons forte e tem uma elevada polaridade (Martin et al., 1967).

O protocolo de criopreservação de Tirelli, emprega na sua forma original o uso de Soro Fetal Bovino. Entretanto, sabemos, com base em estudos prévios (Vireque et al, 2015; Campos et al, dados não publicados), que o acréscimo de SFB ao meio de cultivo de células de granulosa acarreta na diferenciação destas células no sentido de completar a luteinização. De acordo com

estes autores, há um aumento na produção de estradiol e redução da produção de progesterona e relaxina por células da granulosa em meio livre de soro quando comparado às células cultivadas em meio contendo SFB. Inclusive, Vireque et al, também demonstraram que as células da granulosa provenientes de RA, ou seja, células da granulosa-luteínicas já submetidas ao estímulo do hCG, podem restaurar as características morfológicas e estruturais de células não luteinizadas após o cultivo quimicamente definido livre de soro. Para o uso destas células em sistemas de co-cultivo precisamos que as mesmas mantenham um comportamento de fase folicular. Para tanto houve necessidade de testar a interferência do SFB usado no meio de vitrificação, proposto pelo protocolo adotado, com relação ao comportamento funcional das células. Verificamos que não houve interferência deste suplemento quando utilizado somente no meio de criopreservação no processo de diferenciação celular, analisado por morfologia, viabilidade e produção hormonal, viabilizando o emprego do protocolo original, sem necessidade de adaptações.

Do ponto de vista do comportamento celular, Portella e colaboradores (2010) (descrevem que o plaqueamento de menores densidades celulares para cultivo em meio livre de soro propicia a célula a maior secreção de estradiol e uma característica mais compatível com fase folicular (Portella et al., 2010), neste sentido a dificuldade em se obter grande número de células no recuperado levou à cultivos com menores densidades celulares e provavelmente favoreceu o perfil de célula desejado.

Sendo assim, este estudo apresenta uma técnica viável de armazenamento de células de granulosa humana para uso eletivo em sistemas de co-cultivo de oócitos e embriões, a fim de melhorar os resultados reprodutivos em ciclos de fertilização *in vitro*. De acordo com o estudo de Casillas e colaboradores (2014) onde foi testado o co-cultivo de oócitos imaturos de suínos desvitrificados com células da granulosa frescas, observou-se que as células da granulosa em co-cultura com os oócitos parecem se reorganizar e cercar os oócitos em camadas ordenadas e após 44 h são capazes de gerar a matriz extracelular, e notavelmente a maturação desses oócitos aumentou em 49%. Para tanto lembramos que é necessário a manutenção da viabilidade das células da granulosa para que a MIV seja eficiente. Estudos anteriores em oócitos desnudos de

bovinos e camundongos mostraram que o co-cultivo com células do cumulus aumentou a maturação e taxas de fertilização (Zhang et al., 1995; Ge et al., 2008).

Uma das possíveis justificativas para um potencial efeito benéfico do sistema de co-cultivo com granulosa é que a retomada meiotica dos oócitos não é unidirecional a partir das células somáticas para os oócitos, mas bidirecional, portanto a presença das células do cumulus é de grande importância para manter as junções gap e adquirir competência para o desenvolvimento e funções mitocondriais durante a maturação (Wigglesworth et al., 2013). Estes sinais parácrinos das células do cumulus podem aumentar a maturação do oócito (Price & Buratini, 2011). Por exemplo, a retomada meiotica e a capacidade do desenvolvimento do oócito são aumentadas pelos sinais de EGF-L das células da granulosa, o EGF-L é conhecido como um eficiente indutor da retomada meiotica em várias espécies incluindo os suínos. (Prochazka et al., 2003).

Uma das dificuldades encontradas na realização deste estudo esteve relacionada com recuperação de células para cultivo, uma vez que a alta vulnerabilidade dessas células e a baixa recuperação de células a partir do fluido folicular aspirado nos procedimentos de captação de oócitos não permitia a obtenção de concentrações suficiente para plaqueamento das mesmas. Isso acabou levando à exclusão de inúmeras amostras inicialmente incluídas. Por conta disto, incluímos como critério de inclusão que a paciente doadora apresentasse no momento da indicação para captação, ao menos, 8 folículos maiores que 14 mm. Além disso, como o objetivo do estudo era a padronização da técnica, o desenho do estudo exigiu critérios rígidos de inclusão, com objetivo de minimizar o impacto de variáveis individuais das amostras sobre o desfecho, uma vez que a viabilidade e capacidade funcional que foram avaliadas após o descongelamento poderiam ser comprometidas por má qualidade da amostra. Neste sentido poucas eram as pacientes que preenchiam todos os critérios de inclusão.

Outra dificuldade encontrada se referiu à separação das CGs das células sanguíneas presentes no fluido folicular do aspirado, em alguns casos o uso da coluna de histopaque não foi suficiente e a presença de sangue no cultivo foi extremamente prejudicial, demandando a exclusão destas culturas. Além de contaminações pontuais no cultivo, algumas provavelmente

provenientes da própria paciente doadora, outras mais tardias, provavelmente ambientais ou secundárias à manipulação.

Sendo assim, há necessidade de ressaltar que este é o primeiro relato de protocolo de criopreservação de células da granulosa humana, com manutenção da capacidade funcional das células e com células que, apesar de recuperadas após o estímulo do hCG, mantém comportamento de células de fase folicular. Existem, de fato, algumas limitações neste estudo. A baixa recuperação de células frescas após o cultivo não permitiu a contagem pré-congelamento, apenas após o descongelamento pré-cultivo, portanto não sabemos quantas células viáveis efetivamente foram congeladas no experimento 2C.

6. Conclusões

1. Foi apresentado neste estudo um protocolo eficiente de congelamento de células de granulosa humana obtidas a partir do fluido folicular de pacientes submetidas à procedimento de Fertilização *in vitro*. A criopreservação promove a morte de parte da população de células da granulosa congeladas mesmo na presença de crioprotetor, entretanto, a viabilidade, capacidade funcional e a morfologia das células viáveis recuperadas, ficam preservadas.

2. A criopreservação das CGs humanas seguida de cultivo em meio livre de soro permite a diferenciação de células com comportamento funcional de fase folicular, com predominância na produção ascendente de estradiol e aumento progressivo da relação Estradiol/Progesterona.

3. O uso de soro fetal bovino no meio de criopreservação das CG humanas não interferiu no comportamento das células em cultivo após o descongelamento.

7.Referências

- Abdel-Ghania MA, Shimizu T, Asano T, Suzuki H. *In vitro* maturation of canine oocytes co-cultured with bovine and canine granulosa cell monolayers. **Theriogenology** 2012; 77: 347–355.
- Adeldust H., Zeinoaldini S., Kohram H., Roudbar MA., Joupari MD. In vitro maturation of ovine oocyte in a modified granulosa cells co-culture system and alpha-tocopherol supplementation: effects on nuclear maturation and cleavage. **Journal of Animal Science and Technology** (2015) 57:27.
- Amsterdam, A. & Rotmensch, S. Structure-function relationships during granulosa celldifferentiation. *Endocrine reviews* (1987) 8, 309-337.
- Ancioto KL, Vantini R, Garcia LM, Mingoti GZ. Influência das células do cumulus e do meio de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. **Acta Scientiae Veterinariae**. 2004;32:118.
- Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. **Hum Reprod Update** 2001; 7(4): 394-403.
- Barrett SL., Woodruff TK. Gamete preservation. **Cancer Treat Res**.2010;156:25-39.
- Buratini J., Price CA. Follicular somatic cell factors and follicle development. **Reprod Fertil Dev**. 2011;23(1):32-9
- Campos CO, Bernuci MP, Vireque AA, Campos JR, Silva-de-Sá MF, Jamur MC, Rosa-e-Silva ACJS. Preventing Microbial Contamination during Long-TermIn VitroCulture of Human Granulosa-LuteinCells: An UltrastructuralAnalysis. **Obstetrics and Gynecology**. 2012. Pages 152781.
- Campos CO, Vireque AA, Bernuci MP, Campos JR, Sá MFS, Ferriani RA, Jamur MC, Rosa-e-Silva ACJS. Human granulosa cells display ultrastructural and functional characteristics of non-luteinized cells after culture in a serum-free chemically defined medium. 2014. Tese de mestrado - dados submetidos à publicação.
- Campos JR., Rosa-e-Silva JC., Carvalho BR., Vireque AA., Silva-de-Sá MF., Rosa-e-Silva AC. Cryopreservation time does not decrease follicular viability in ovarian tissue frozen for fertility preservation. **Clinics** (São Paulo) 2011a; 66(12):2093-2097.
- Campos JR., Ting AY., Yeoman RR., Lawson MS., Rosa-e-Silva ACJS., Zelinski MB. Cryopreservation of isolated secondary follicles from nonhuman primate using a closed system and quartz capillaries. **J Assist Reprod Genet** 2011b; 28:997–8.
- Casillas F, Teteltitla-Silvestre M, Ducolomb Y, Lemus AE, Salazar Z, Casas E, Betancourt M.Co-culture with granulosa cells improve the in vitro maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock, **Cryobiology** 69 (2014) 299–304.
- Cobo A., Garcia-Velasco JA., Domingo J., Remohí J., Pellicer A. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? **Fertil Steril**. 2013;99:1485–95.
- David A., Van Langendonck A., Gilliaux S., Dolmans MM., Donnez J., Amorim CA. Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of Kit ligand and anti-mullerian hormone in human ovarian tissue. **Hum Reprod**. 2012;27:1088–95.
- Demirci B., Lornage J., Salle B., Frappart L., Franck M., Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. **Fertil Steril**. 2001;75(4):754-762.

Donnez J., Martinez-Madrid B., Jadoul P., Van Langendonckt A., Demylle D., Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Hum Reprod Update**. 2006;12:519–35.

Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. **Hum Reproduction** 2012; 18: 536–554.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause, **Hum. Reprod.** 1992; 7:1342–1346.

Feng G., Shi D., Yang S., Wang X. Co-culture embedded in cumulus clumps promotes maturation of denuded oocytes and reconstructs gap junctions between oocytes and cumulus cells. *Zygote* 21 (August), pp. 231–237. C _ **Cambridge University Press** 2012

Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca 2008: 303-327.

Ge L, Sui HS, Lan GC, Liu N, Wang JZ, Tan JH. Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events, **Fertil. Steril.** 90 (2008) 2376–2388.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci.** 2004;82-83:431-46.

Goovaerts IG., Leroy JL., Rizos D., Bermejo-Alvarez P., Gutierrez-Adan A., Jorssen EP., Bols PE. Single in vitro bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. **Theriogenology**. 2011 Oct 15;76(7):1293-303.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular estrogen synthesis: the 'two-cell, two- gonadotrophin' model revisited. **Mol Cell Endocrinol**, v.100, n.1-2, Apr, p.51-4. 1994.

Khatir H, Anouassi A, Tibary A. Production of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos by IVM and IVF and coculture with oviductal or granulosa cells. **Theriogenology** 2004; 62:1175–85.

Kim SS, Battaglia DE, Soules MR. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. **Fertil Steril** 2001; 75(6): 1049-56.

Kleinhans FW, Mazur P. Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest. **Cryobiology** 2007; 54:212–222.

Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**. 2007 Jan 1;67(1):73-80.

Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **J Clin Oncol** 2006; 24:2917-2931.

Li Z. et al. A co-culture system with preantral follicular granulosa cells in vitro induces meiotic maturation of immature oocytes. **Histochem Cell Biol** 2011; v.135, n.5, May, p.513-22.

Maeda J, Negami A, Kimtani N, Tominaga T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. **Biol Reprod** 1996;54:930–6.

Martin, D., Weise, A., Niclas, H. J. The Solvent Dimethyl Sulfoxide. **Angew. Chem., Int. Ed. Engl.** 1967, 6, 318.

Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **J Gen Physiol** 96;47:347–369.

Mochizuki H, Fukui Y, Ono H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. **Theriogenology** 1991; 36:973– 86.

Nottola S.A, Heyn R, Camboni A, Correr S, Macchiarelli G. Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization. **Stefania -Microscopy Research and Technique** 2006; 69:508–516.

Oktay K, Sonmezer M. Chemotherapy and amenorrhea: Risks and treatment options, **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**2008; 20:408–415.

Portela VM.,Zamberlam G., Price CA. Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells.**Fertil Steril.** 2010 Apr;93(6):2050-5.

Prochazka R, Kalab P, Nagyova E. Epidermal growth factor-receptor tyrosinekinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro, **Biol. Reprod.** 68 (2003) 797–803.

Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiaer E, Kjeldsen L, Andersen MK, Andersen CY. Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia, **Fertil. Steril.** 2010; 94:2186–2190.

Schmidt KT, Larsen EC, Andersen CY, Andersen AN. Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease, **BJOG** 2010;117:163–174.

Schramm BD, Bavister RD. Effects of granulosa cells and gonadotrophins on meiotic and developmental competence of oocytes in vitro in non-stimulated rhesus monkeys. **Hum Reprod** 1995; 10:887–95.

Sharma R., Kattoor AJ., Ghulmiyyah J., Agarwal A.Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. **Syst Biol Reprod Med.**2015 Jan;61(1):1-12.

Sluss PM., Lee K., Mattox JH., Smith PC., Graham MC., Partridge AB. Estradiol and progesterone production by cultured granulosa cells cryopreserved from in vitro fertilization patients. **Eur J Endocrinol** 1994;130:259–64.

Smitz JEJ, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction** 2002; 123:185-202.

Staigmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Res** 1984;9:221–9.

Stoop D, Cobo A, Silber S. Fertility preservation 3. Fertility preservation for age-related fertility decline. **Lancet** 2014; 384: 1311–19.

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum Reprod Update**. 2003; 9(1):35-48.

Tagler D, Tu T, Smith RM., Anderson NR., Tingen CM., Woodruff TK, Shea LD. Embryonic Fibroblasts Enable the Culture of Primary Ovarian Follicles Within Alginate Hydrogels. **Tissue Engineering**, 2012; v 18, n.11 e 12.

Teotia A, Sharma GT, Majumdar AC. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayers. **Small Rum Res** 2001;40:165–77.

Tilly JL., Kowalski KI., Schomberg DW., Hsueh AJW. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. **Endocrinology** 1992; 131:1670-1676.

Ting AY., Yeoman RR., Lawson MS., Zelinski MB. *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Hum Reprod** 2011;26:2461–72.

Tirelli M. Basini G , Grasselli F, Bianco F, Tamanini C. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. **Domestic Animal Endocrinology** 28 (2005) 17–33.

Tsafiriri A., Braw RH. Experimental approaches to atresia in mammals. In: Clarke JR (ed.), **Oxford Reviews of Reproductive Biology**. Oxford: Clarendon Press; 1984: 226-265.

Vireque AA, Campos JR, Dentillo DB, Bernuci MP, Campos CO, Sá MFS, Ferriani RA, Nunes AA, Rosa-e-Silva ACJS. Driving human granulosa-luteal cells recovered from in vitro fertilization cycles toward follicular phase phenotype. 2014. **Reprod Sci**.2015 Aug;22(8):1015-27.

Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause, **PLoS ONE** 2010;5: e8772.

Wigglesworth K, Lee KB, MJ OB, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 110 (2013) 723–729.

Yoon JD., Jeon Y., Cai L., Hwang SU., Kim E., Lee E., Kim DY., Hyun SH. Effects of coculture with cumulus-derived somatic cells on in vitro maturation of porcine oocytes. **Theriogenology** 83 (2015) 294–305.

Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro, **Mol. Reprod. Dev.** 40 (1995) 338–344.

Anexo 1. Termo de consentimento LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa: "Padronização da metodologia de congelamento de células da granulosa antrais humanas para suporte no co-cultivo com oócitos imaturos. "

Pesquisador Responsável: Professora Doutora Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Pesquisadores envolvidos: Professor Doutor Rui Alberto Ferriani; Professor Doutor Marcos Felipe Silva de Sá; Alessandra Aparecida Vireque (bióloga); Maria Cristina Picinato Medeiros Araújo (bióloga); Marina Meirelles Machado (biomédica), Jacira Ribeiro Campos (biomédica).

1. Conteúdo

Este texto é direcionado às mulheres, entre 18 e 40 anos, que serão submetidas a procedimento de Reprodução Assistida para tratamento de infertilidade e tem a intenção de convidar a senhora a participar do Banco de Amostras de células da granulosa após explicar-lhe exatamente qual o objetivo deste banco e o que são exatamente as células que você doará para pesquisa.

1. O que são células da granulosa?

Os folículos ovarianos são formados pelo óvulo e por outras células chamadas granulosa e teca. As células da granulosa são células que formam "a casa" do óvulo com função de estimular e permitir o seu desenvolvimento até o ponto de ser fertilizado por um espermatozoide, quando então ocorre a ovulação.

Após a ovulação (no caso do ciclo natural) ou após a aspiração de óvulos (no caso das fertilizações *in vitro*) as células da granulosa não tem mais função e são eliminadas pelo organismo ou descartadas pelo laboratório.

2. Justificativa e objetivo da pesquisa:

Quando aspiramos os óvulos durante o tratamento de fertilização *in vitro*, alguns destes óvulos não conseguiram terminar seu amadurecimento, entretanto somente a partir de óvulos maduros que os embriões serão originados. Essa é uma pesquisa que vai estudar uma maneira de congelar as células da granulosa (células que fazem parte do folículo) e cultivá-las, para tentar encontrar uma forma de amadurecer óvulos imaturos, melhorando o resultados dos tratamentos. Queremos criar um sistema de cultivo que consiga fazer estes óvulos (já aspirados) amadurecerem, para podermos aproveitá-los para formar embriões. É importante chamar a atenção para o fato de que as células da granulosa não são usadas para formar o embrião, elas só são úteis enquanto o óvulo ainda está crescendo, ou seja, antes da aspiração. Durante a aspiração, vêm junto com o óvulo, várias células da granulosa que serão desprezadas, juntamente com o líquido do

folículo (que é chamando de fluido folicular).

3. Os procedimentos que serão utilizados para a pesquisa:

Para este estudo não será realizado nenhum procedimento adicional além daquele que você já vai realizar para fazer o tratamento de fertilização *in vitro*. As medicações usadas, a anestesia e a maneira de coletar os óvulos são feitas de maneira rotineira. A única diferença é que as células da granulosa que seriam descartadas serão guardadas juntamente com o líquido folicular, quando normalmente este material é descartado.

4. Os riscos esperados:

Os riscos são os mesmos já presentes no procedimento de fertilização *in vitro*. Nenhum risco adicional acontecerá por conta desta pesquisa.

Assim, tendo lido todo o texto e recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, eu, _____,

_____, RG _____, Registro no HCFMRP _____, concordo e aceito o convite para participar como **VOLUNTÁRIA** da pesquisa em questão, doando minhas células da granulosa e o líquido folicular para pesquisa após a aspiração dos óvulos.

São meus direitos:

1. Possuir uma cópia deste documento, ficando outra igual com o pesquisador responsável;
2. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa para a qual sou voluntária;
3. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, em qualquer fase dele, sem penalização alguma e sem que isso traga prejuízo ao meu cuidado;
4. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
5. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando.

Ribeirão Preto (SP), ____ de _____ de ____.

VOLUNTÁRIA: _____

RESPONSÁVEL: _____ (Dra Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva)

Você poderá encontrar a Dra. Ana Carolina, das 07:30h às 17:00h, no endereço:

Hospital das Clínicas da FMRP-USP / Campus Universitário

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia - 1º andar

Bairro Monte Alegre / Ribeirão Preto - São Paulo - CEP: 14.048-900

Telefones: (16) 3602-2814 / 3602-2815 / 3602-2817

ou pelo e-mail: anasars@fmrp.usp.br

**Padronização da metodologia de congelamento de células da
granulosa antrais humanas para suporte no co-cultivo com oócitos
imaturos**

Marina M. Machado, Ana C.J.S. Rosa-e-Silva

Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brasil.

Resumo

As técnicas de cultivo de folículos e oócitos *in vitro*, com o objetivo de se obter oócitos maduros para procedimentos de Reprodução Assistida (RA), têm sido aplicadas em diferentes contextos. O sucesso destes procedimentos está diretamente relacionado ao sistema de cultivo utilizado. A utilização de células da granulosa (CG) humanas cultivadas *in vitro* como um suporte para o co-cultivo destes oócitos imaturos e folículos tem sido descrita por alguns autores. A criopreservação destas células, considerando-se o contexto de sua obtenção em procedimentos de RA, permitiria a viabilização da aplicação destas células na prática clínica diária. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi padronizar o congelamento de células da granulosa (CG) humanas para aplicação em sistemas de co-cultivos de folículos e oócitos imaturos. Foram obtidas CG de 20 voluntárias em tratamento de reprodução assistida, 10 foram cultivadas em meio α -MEM suplementado para interrupção da luteinização e congeladas após 48 horas em container “Cryostep” (grupo 2C- 2 cultivos) (etapa 2) e 10 foram congeladas em container “Cryostep” sem cultivo prévio (grupo CD- congelamento direto) (etapa 3). Após o descongelamento estas células foram (re)cultivadas por 144 horas, com troca de meio em 48, 96 e 144 horas para avaliações da produção de estradiol (E2) e progesterona (P4) (ng/mL). Verificamos redução na contagem celular e na viabilidade celular tanto no método de congelamento direto (CD) quanto no método com dois cultivos (2C) após o descongelamento ($p < 0,05$), e isso se refletiu na produção de estradiol e progesterona que foi maior nas culturas de células frescas em relação às células criopreservadas ($p < 0,05$). Porém, a relação de E2/célula foi mantida após o descongelamento, sugerindo que esta redução na produção se deve à redução no número de células, as que sobrevivem se mantêm normofuncionantes ($p = 0,23$). O CD foi mais eficiente pois permitiu uma maior recuperação celular e uma melhor viabilidade quando comparado ao grupo 2C. A relação estradiol/progesterona foi mantida em todos os tempos de cultivo, fresco, CD e 2C ($p > 0,05$), indicando que a característica funcional destas células foi preservada após o descongelamento. Concluímos que a criopreservação de CG humanas obtidas durante a captação de oócitos compromete a contagem celular e a viabilidade geral da cultura, entretanto, a capacidade funcional e a característica destas células se mantem preservada (manutenção das relações E2/célula e E2/P4).

Palavras-chave: Células da granulosa, criopreservação, maturação oocitária, viabilidade, congelamento lento, co-cultivo, maturação folicular.

Introdução

A criopreservação de tecido ovariano vem sendo utilizada como técnica de preservação de fertilidade, e embora ainda seja considerada experimental (Lee et al., 2006), os resultados são bastante aceitáveis quando se propõe o reimplante do tecido (Stoop et al., 2014). Entretanto, considera-se que o reimplante deste tecido é arriscado, a depender da doença oncológica de base, podendo ocorrer a reinserção de células malignas, possíveis causadoras de recorrência do câncer nestas pacientes, uma vez que o mesmo não foi tratado pelo quimioterápico (Rosendahl et al., 2010). Novas alternativas para a aplicação do tecido criopreservado vem sendo estudadas. Uma delas é a extração de folículos imaturos a partir do tecido, os quais poderão ser maturados *in vitro* para posterior procedimento de reprodução assistida (RA).

Na prática, os resultados dos procedimentos de maturação de folículos em humanos são ainda insatisfatórios, porém protocolos de cultivo de folículos secundários em outras espécies já obtiveram nascidos vivos, e prole fértil (Xu et al., 2006). Vários protocolos envolvendo diferentes suplementações dos meios de maturação *in vitro* tanto para folículos como para oócitos imaturos vem sendo propostos. Neste sentido, a composição do meio de cultivo é extremamente importante para a um adequado crescimento folicular e a maturação do oócito (Smitz & Cortvrindt, 2002). Várias substâncias adicionadas podem influenciar a sobrevivência e o crescimento folicular, incluindo antibióticos, tampões, substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, monossacarídeos, etc.), diferentes fontes proteicas, antioxidantes, hormônios e diversos fatores de crescimento (Figueiredo et al., 2008). O uso de células somáticas suplementando a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos durante a fertilização *in vitro* (FIV) tem sido descrita por alguns autores (RefXXXX). Entre as diferentes linhagens de células que podem ser utilizadas na co-cultura encontram-se as células da granulosa. Existem evidências de que a suplementação do meio de MIV com células da granulosa melhora a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos em bovinos (Maeda et al., 1996), ovelhas (Staigmiller & Moor, 1984), cabras (Teotia et al., 2001), camelos (Khatir et al., 2004), cães (Abdel-Ghani et al., 2012) e macacos (Schramm & Bavister, 1995), como também a incidência de fertilização normal (Mochizuki et al., 1991). Os benefícios da presença dessas células durante a maturação *in vitro*

podem ser atribuídos à formação de um microambiente favorável (bioquímico e metabólico) ao redor do oócito (Sutton et al., 2003), e o uso destas células na MIV de folículos possivelmente aumentariam as chances de se atingir o estágio de maturação necessário para procedimentos de fertilização assistida.

Embora o estágio de desenvolvimento dos folículos e oócitos a serem maturados *in vitro* seja a fase folicular, os sistemas de cultura de células da granulosa humana desenvolvidos nas últimas duas décadas têm sido caracterizados por um consistente declínio na produção de estradiol no decorrer do tempo de cultura enquanto a síntese de progesterona (P4) aumenta, sugerindo início de luteinização. Esta característica é observada, pois as células cultivadas são obtidas durante procedimentos de RA, a partir de folículos onde a maturação já foi induzida artificialmente pela administração de hCG ou LH 34 a 36 horas antes da punção. Sendo assim, o perfil das células obtidas não é adequado para a finalidade proposta. Porém, no estudo de Vireque e colaboradores (2015), foi demonstrada que é possível a interrupção, ao menos parcial, do processo de luteinização dessas células manipulando-se a composição do meio de cultivo, conservando-se as características de fase folicular. (Vireque et al., 2015; Campos et al., 2014)

A viabilização da aplicação prática destes sistemas de co-cultivo fica bastante dificultada pela necessidade de sincronização entre os processos de obtenção e cultivo das CGs e o procedimento de MIV, uma vez que a interrupção do processo de luteinização demanda cultivo prévio ao seu uso no sistema de co-cultivo. Uma alternativa seria a criopreservação das CGs, onde as amostras podem ser estocadas na forma de “alíquotas” para uso futuro, de maneira que não há necessidade desta sincronização. Além disso, a estocagem destas amostras na forma de banco permitiria um período de quarentena após o qual as mesmas poderiam ser retestadas para garantir a ausência de contaminação. Ou seja, tem-se em vista a otimização e a segurança dos processos de co-cultivo de folículos e oócitos imaturos aplicados na rotina da prática assistencial.

Tirelli e colaboradores (2005) realizaram um estudo com células da granulosa de porcas submetidas a congelamento lento onde se constatou que as células recultivadas após o congelamento apresentaram aumento significativo de estrogênios basais onde foi feita adição de FSH ao meio crioprotetor, indicando manutenção do potencial de esteroidogênese destas células.

Os autores também demonstraram que o congelamento não compromete a proliferação e a viabilidade das células da granulosa de porcas submetidas ao processo de criopreservação independentemente da suplementação do meio com FSH (Tirelli et al., 2005). Sendo assim, este estudo teve como objetivo implementar a técnica de criopreservação de células de granulosa humana obtidas em procedimentos de Reprodução Assistida para posterior aplicação como suporte para co-cultivo de folículos e oócitos imaturos; e avaliar o impacto da criopreservação na viabilidade e função das células da granulosa.

Metodologia

Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e em seguida submetido ao comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) (CAAE: CAAE: 10860912.0.0000.5440. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) deste projeto.

Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo experimental em células da granulosa humanas. Este estudo foi dividido em 3 etapas:

- Etapa 1: No protocolo original de Tirelli (2005), o meio de congelamento prevê a suplementação com soro fetal bovino (SFB). No protocolo definido para o desenvolvimento de células da granulosa com características de fase folicular desenvolvido em nosso laboratório (Campos et al. 2014- dados submetidos à publicação) e (Vireque et al, 2015) há necessidade de meio livre de soro para que não ocorra o processo de luteinização nas células cultivadas. Desta maneira, preocupados com a interferência do meio de criopreservação na característica das colônias optamos por comparar o protocolo com SFB (Tirelli et al, 2005) com o suplementado somente com SSS (soro sintético substitutivo), a fim de verificar o impacto sobre as células cultivadas em termos de atividade esteroidogênica.
- Etapa 2 ou experimento 2C (2 cultivos): Definido o uso do protocolo de criopreservação contendo SFB foram iniciados os testes para o congelamento das células de granulosa já cultivadas (com características definidas de fase folicular no pós cultivo), comparando-se as características morfofuncionais das células em cultivo, antes e após o congelamento lento.
- Etapa 3 ou experimento CD (congelamento direto): Verificado, a partir do experimento 2, haver grande comprometimento da recuperação de células após o congelamento e lavagem, porém

com características de viabilidade e funcionalidade preservadas, optou-se pelo congelamento prévio ao cultivo, sendo este último realizado somente após o descongelamento das mesmas.

Recrutamento das pacientes

As CG humanas foram obtidas de aspirados de fluido folicular destinados ao descarte, resultantes da captação de oócitos em ciclos de RA de pacientes tratadas no serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). CG de 10 voluntárias foram cultivadas para dosagem da produção de E2 e P4 durante as 48, 96 e 144 horas de cultivo.

Critérios de inclusão:

- idade entre 18 e 40 anos;
- apresentarem ciclos ovulatórios e FSH menor que 12 mIU/mL;
- ter indicação de reprodução assistida por fator de infertilidade masculino ou tubário;
- apresentarem ao mínimo 8 folículos maiores que 14 mm no momento da indicação para a captação;
- concordância em assinar o TCLE.

Critérios de exclusão:

- presença de endocrinopatias como hiperplasia adrenal congênita, hiperprolactinemia, doenças tireoidianas, ainda que compensadas;
- pacientes com endometriose ou com falhas de fertilização em ciclos anteriores;
- uso de medicamentos como tratamento com glicocorticóides ou antiandrogênios por um período mínimo de 60 dias antecedentes ao início da indução.

Tratamento das pacientes voluntárias

As pacientes receberam anticoncepcional oral de baixa dosagem (Etinilestradiol 20 + Gestodeno 75), iniciado entre o 1º e o 5º dia do ciclo precedente ao ciclo de indução e até 5 dias antes da data programada para iniciar a indução com gonadotrofina.

O bloqueio hipofisário foi realizado com análogo agonista do Hormônio Liberador das Gonadotrofinas (GnRHa), Acetato de Cetrorrelix ®- Merck- 0,25mg/dose com dose única diária quando 01 ou mais folículos atingem 14mm e mantida até o dia da administração da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG).

No dia programado para o início da indução da ovulação, a paciente foi submetida a exame de ultrassonografia com a finalidade de avaliar os ovários e anatomia uterina. Para a indução foi administrado FSH recombinante (Gonal® – Laboratório SERONO ou Puregon® – Laboratório ORGANON) em doses variáveis, de acordo com a resposta da paciente, por via subcutânea (sc) sempre às 18 horas. O ajuste de dose foi feito com base no recrutamento e crescimento folicular acompanhado pela ultrassonografia transvaginal seriada. Na presença de pelo menos dois folículos com diâmetro superior a 17 milímetros (mm), foi administrado hCG recombinante (Ovidrel®- SERONO) na dose de 250µg às 22 horas. Após um intervalo de 34 a 36 horas, foi realizada a captação dos oócitos.

Os folículos foram puncionados e os aspirados de fluido folicular com as CG que normalmente seriam descartados, foram encaminhados imediatamente para os procedimentos preparatórios para o cultivo celular.

Recuperação das Células da Granulosa dos aspirados foliculares

A recuperação das CG foi realizada de acordo com o protocolo previamente descrito por (Campos et.al., 2012; Campos et.al., 2014; Vireque et.al., 2015). Todo o procedimento utilizando o meio α -MEM. Para determinação da concentração e o número de células viáveis, utilizou-se o método de exclusão do Azul de Tripan também descrito anteriormente por (Campos et.al., 2012; Campos et.al., 2014; Vireque et.al., 2015). O número total de células e o número de células coradas foram contados. A viabilidade foi estimada dividindo-se o número de células viáveis pelo número total de células e os resultados analisados em porcentagem.

Cultura das células da granulosa Protocolo Original com 2 cultivos (2C)

As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços em meio α -MEM (Invitrogen,

Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY) com bicarbonato de sódio suplementado com Hepes, antibiótico, PVP, androstenediona, FSH, IGF-I, transferrina e selênio (modificado de Campos et al., 2012). Aproximadamente 125.000 células viáveis em meio foram semeadas em cada poço das placas de cultura contendo 1000 μ L de meio de cultura previamente equilibrado. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e mantidas durante 48 horas e em seguida congeladas, o controle foi mantido por 144 horas em cultivo com 70% do meio trocado a cada 48 horas. (Gutiérrez et al., 1997).

Dosagens hormonais

Os meios de cultura foram retirados a cada 48 horas para as dosagens de estradiol e progesterona, e foram mantidos a -20°C até a realização da leitura. As dosagens foram realizadas pelo método de quimioluminescência descrito por (Campos et.al., 2012; Campos et.al., 2014). As análises foram feitas em duplicata e os ensaios foram realizados no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP.

Congelamento convencional lento- Protocolo Original com soro feral bovino (2C-SFB)

As células foram retiradas da cultura e colocadas em um tubo para centrifugação sendo um tubo por paciente a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C. As CG foram ressuspendidas em criotubo nalgene (Nalgene Company, Rochester, NY, USA) contendo 250 μ L de meio de cultura α -MEM suplementado com 50% de soro fetal bovino(Fetal Bovine Serum Gibco®) e foram deixadas no gelo por 20 minutos. Em seguida foram adicionados 250 μ L de meio α -MEM contendo 20% DMSO (Dimethyl sulfoxide, SIGMA Aldrich) ao criotubo e deixado no gelo por mais 20 minutos para que ocorresse o equilíbrio do crioprotetor. Logo após, os criotubos foram colocados em um container “Cryostep” da (Nalgene Company) em um freezer -80°C para que ocorresse o congelamento a uma faixa de 1°C/min. Depois de 24 horas, os criotubos foram mergulhados em nitrogênio líquido e estocados até descongelamento.

Para a etapa 1, metade de cada amostra foi criopreservada substituindo-se o SFB por SSS (Serum Substitute Supplement™ (SSS™) Invive Scientific).

Em todos os experimentos realizados, para descongelamento dessas células, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e mergulhados em banho de água a 37°C por 2 minutos, as células foram lavadas duas vezes em 2 mL e 1 mL de meio de cultura α –MEM e centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C para que fosse retirado todo o crioprotetor. Em seguida contadas e plaqueadas (adaptado de Tirelli et al., 2005).

Protocolo de Congelamento Modificado sem cultivo prévio (Congelamento Direto -CD)

Com a grande perda de células ao longo do processo de preparo para o cultivo e durante o cultivo em si, optamos por testar o congelamento em células não cultivadas previamente (Etapa 3), ou seja, sem induzir a interrupção do processo de luteinização das células. O objetivo foi o de criopreservar um maior número de células em cada procedimento, o que provavelmente otimizaria a recuperação das mesmas células posteriormente e o procedimento como um todo.

As células recuperadas foram criopreservadas sem cultivo prévio utilizando-se o protocolo original de congelamento com SFB descrito no item anterior e descongeladas seguindo o mesmo protocolo.

Viabilidade Celular

Após a recuperação de CG de aspirados foliculares, foi retirada amostra da suspensão celular para determinação da concentração e o número de células viáveis, segundo método de exclusão do Azul de Tripan segundo (Campos et.al., 2012; Campos et.al., 2014; Vireque et.al., 2015). Brevemente, 10 μ L de suspensão celular foram misturados em 90 μ L de Azul de Tripan a 0.4% diluído em PBS. O corante utilizado foi sempre recém-preparado para cada experimento e o eppendorf com a alíquota mantida em geladeira e gelo. A contagem foi feita em Câmara de Neubauer. O número total de células e o número de células coradas foram contadas. A viabilidade foi estimada da seguinte forma: número de células viáveis / número total de células X 100.

Análise estatística

Para atingir os objetivos foram realizados modelos lineares de efeitos mistos uma vez que existem medidas ao longo do tempo. Foi checada a distribuição dos resíduos através de gráficos de normalidade e de dispersão entre o resíduo versus o predito. As variáveis E2 no experimento 1 e 3 e a variável E/P no experimento 3 não apresentaram distribuição normal, nesta situação foi realizada uma transformação logarítmica. A análise foi implementada no ProcMixed no programa SAS versão 9.3.

Resultados

Etapas 1: Determinando o melhor protocolo de congelamento (CSFB x CSSS)

Do ponto de vista morfológico das culturas, verificou-se que cem por cento das culturas plaqueadas com células à fresco apresentaram formação de clusters, com padrão característico de fase folicular. Após o descongelamento, 11 das 30 amostras cujo material foi adequadamente recuperado para novo plaqueamento (37%) não apresentaram características esperadas após o cultivo, ou seja, as células não se agruparam na forma de clusters. Em todos estes casos não houve a formação de clusters nem no grupo SSS e nem no SFB. Além disso, a viabilidade das células foi semelhante entre os grupos (Tabela 1).

Na comparação entre o uso de SFB ou SSS na suplementação do meio de criopreservação verificamos que não houve influência destas substâncias no padrão de produção hormonal das colônias. A tabela 1 apresenta as dosagens de estradiol e progesterona nos diferentes tempos de cultivo tanto para as células que foram criopreservadas com o SFB quanto para as células criopreservadas com o SSS.

Tabela 3: Viabilidade e produção de estradiol e progesterona utilizando SFB e SSS no meio de criopreservação.

	CSFB	CSSS	p
	média±sd	média ±sd	
Estradiol (ng/mL)	14,44 ± 15,59	13,48 ± 15,20	0,19
Progesterona (ng/mL)	154,7 ± 177,9	148,3 ± 182,1	0,17
Relação E₂/P₄	0,1 ± 0,06	0,12 ± 0,08	0,08
Viabilidade (%)	23,1 ± 7,56	28,69 ± 19,31	1,0

Sendo assim, optamos por manter o protocolo original de congelamento (adaptado de Tirelli et al., 2005) utilizando o SFB na suplementação do meio de congelamento para as etapas subsequentes.

Etapas 2 e 3: Análise do Impacto do congelamento sobre as células - Protocolo de Congelamento Original (CSFB)

Morfologia

As CGs humanas submetidas ao congelamento lento, tanto as do experimento 2C quanto as do CD, apresentaram características semelhantes às encontradas no cultivo fresco em relação à morfologia dos clusters em geral. Porém observa-se que o tamanho dos mesmos é ligeiramente reduzido nos cultivos criopreservados. A quantidade de células mortas decantadas é visivelmente maior nos poços de cultivo criopreservado (poço sujo), os clusters formados apresentaram-se mais escuros do que os do cultivo fresco, indicando mais uma vez uma quantidade maior de células mortas (Figuras 1 e 2). Além disso, o desenvolvimento dos clusters ao longo dos tempos de cultivo demonstram uma formação um pouco mais tardios dos mesmos nos cultivos de células descongeladas em relação ao fresco; com 48 horas o cultivo fresco já tem seus clusters bem definidos, enquanto que os cultivos 2C e CD apresentam clusters menores com agrupamento mais evidente na avaliação de 96 horas (Figura 1).

Figura 1. Imagens dos cultivos fotografados na lupa nos diferentes tempos. A- cultivo fresco 48horas; B- cultivo fresco 96 horas; C- cultivo fresco 144 horas; D- 2C 48 horas; E- 2C 96 horas; F- 2C 144 horas; G- CD 48 horas; H- CD 96 horas; I- CD 144 horas.

Legenda: 2C- 2 cultivos; CD- congelamento direto; H- horas.

Figura 2: Cultivo de Células da Granulosa fresco (A,B,C) e criopreservado (D,E,F). A- 48 horas de cultivo; B- 96 horas de cultivo; C- 144 horas; D- 48 horas; E- 96 horas; F- 144 horas.

Ao realizar a contagem de células e analisar a viabilidade celular, verificou-se que o congelamento prejudica ambos os parâmetros, embora o congelamento direto comprometa menos tanto a viabilidade quanto a contagem de células após o descongelamento (Tabela 2).

Tabela 4: Concentração e viabilidade celular dos cultivos fresco, CD e 2C

	Fresco	CD	2C	p
	média ± sd	média ± sd	média ± sd	
	N=12	N=10	N=12	
Contagem [CG]/100µL	1.031.600± 665.889^{a,b}	477.200± 258.716^{a,c}	156.833± 194.985^{b,c}	<0,01
Viabilidade %	69,5 ±11,73^{d,e}	39,08±9^{d,f}	23,1±7,56^{e,f}	<0,01
Rel. E2/nº céls.	0,0002148± 0,00008510	0,0002947± 0,0001518	0,0005078± 0,0006554	0,5

Legenda: CD-congelamento direto; 2C-2 cultivos; E2-estradiol; CG-células da granulosa. Letras iguais representam diferenças, com $p < 0,05$.

A produção de E2 e P4 foi significativamente maior nas culturas de células frescas em relação às culturas de células criopreservadas. Ao comparar os diferentes tempos de cada cultivo não houve diferença significativa, indicando produção linear de hormônios sem picos, exceto pela redução na produção de progesterona dos tempos 48 para 96 horas no cultivo fresco e no CD (Figura 3). A relação estradiol/progesterona foi mantida após a criopreservação, independente do tempo de cultivo ($p > 0,05$), indicando que a característica funcional destas células foi preservada após descongelamento (Figura 3).

Ao compararmos a produção hormonal das células do congelamento direto (CD) com o das células cultivadas antes e após o congelamento (2 cultivos- 2C), verificamos que a produção de E2 e P4 foi superior em todos os tempos ao longo do cultivo, sem entretanto, modificar a relação E2/P4, ou seja, a interrupção da luteinização também foi eficiente quando o cultivo foi realizado somente após o congelamento (Figura 3).

Figura 3: Curvas de produção hormonal de E2 e P4 nos tempos 48, 96 e 144 horas das células frescas, 2C e CD.

Legenda: Comparações entre os tempos do mesmo grupo são representadas por letras maiúsculas e diferenças entre grupos são representadas por letras minúsculas. Letras iguais representam diferenças estatísticas. ($p < 0,05$). E2-estradiol; P4- progesterona; 2C- 2 cultivos; CD- congelamento direto.

Ao compararmos a relação entre a produção de estradiol após 144hs de cultivo pelo número de células semeadas por poço, verificamos que a produção de E2 por células foi semelhante entre os

grupos fresco, 2C e CD ($p=0,5$) (Tabela 2), indicando que uma vez viável a células recuperada da criopreservação mantém sua capacidade funcional semelhante às células frescas.

Discussão

O uso de células da granulosa como suporte em co-cultivos de ócito e embriões tem sido descrito por alguns autores (Feng et al., 2011; Casillas et al. 2014; Yoon et al., 2015; Adeldust et al., 2015; Goovaerts et al., 2011). Entretanto, o uso na prática clínica destas células, especialmente em humanos, demanda a obtenção das mesmas a partir de procedimentos de Reprodução Assistida, que como sabemos, não tem obtenção previsível, ou seja, dependem do ciclo de resposta à indução de ovulação de cada paciente. Isso condiciona o emprego destas células em co-cultivo à sincronia com o ciclo de fertilização *in vitro* da paciente. Sendo assim, o desenvolvimento de técnicas adequadas para a criopreservação destas células para uso futuro viabiliza o seu emprego nos sistemas de cultivo.

Neste estudo desenvolvemos um modelo de criopreservação de células da granulosa humana com resultado satisfatório de manutenção de viabilidade e função celular. Ou seja, verificamos que as células que sobrevivem ao procedimento de criopreservação mantêm seu comportamento e produção hormonal, o que foi evidenciado pela relação da produção de E2/célula. Estes achados também foram descritos por (Sluss et al., 1994), aonde a criopreservação das CGs não comprometeu sua resposta *in vitro* à ação do FSH. Porém, houve perda de grande parte da população de células ao longo das etapas de processamento das amostras, da criopreservação e do cultivo.

As células da granulosa são conhecidas por serem células muito sensíveis que morrem facilmente. O aumento da apoptose das células da granulosa é desencadeado pela queda do FSH durante a maturação folicular, o que é consistente com a queda da produção das gonadotrofinas como causa da atresia folicular (Tsafriri et al., 1984; Tilly et al., 1992). Por se tratarem de células provenientes de RA, folículos de todos os tamanhos foram puncionados, ou seja, muitas destas células são apoptóticas e quando colocadas em cultivo provavelmente fazem com que a viabilidade do cultivo diminua ao longo do tempo. Com isso o cultivo das CGs nesse estudo durou aproximadamente uma semana.

Na tentativa de minimizar a perda celular secundária ao processamento e cultivo de células antes da criopreservação, optou-se por congelar as células sem cultivo prévio, de maneira que as células recuperadas após a aspiração folicular eram lavadas e submetidas ao protocolo de criopreservação imediatamente. Verificamos que o número de células recuperadas após o descongelamento foi superior em comparação com amostras cultivadas previamente à crio, e a diferenciação celular no cultivo posterior não foi em nada comprometida pela criopreservação. Portanto, o protocolo de congelamento direto utilizado (CD) demonstrou ser mais eficiente do que o de duplo cultivo (2C), simplesmente por proporcionar maior recuperação de células viáveis, visto que o comportamento hormonal das células nos dois procedimentos foi igual, ou seja, a capacidade funcional e a característica destas células ficaram preservadas (manutenção das relações E2/célula e E2/P4).

Quanto ao impacto da criopreservação sobre células e tecidos está bem documentado na literatura. Vários estudos têm demonstrado perda parcial da viabilidade de tecidos (Campos et al., 2011a; David et al., 2012; Donnez et al., 2006; Ting et al., 2011), gametas (Cobo et al., 2013; Sharma et al., 2015; Woodruff & Barrett, 2010)), embriões (Kuwayama 2007) e folículos (Campos et al., 2011b; Demirci et al., 2001;) quando submetidos às diferentes técnicas de congelamento. A criopreservação pode ser feita de várias formas, mas principalmente visa manter a viabilidade celular através do uso de crioprotetores que substituem a água do interior das células e previnem a formação de cristais de gelo no interior das mesmas. Entretanto é um procedimento tóxico onde eventualmente uma grande quantidade de células não sobrevivem. (Edgar & Gook, 2012; Arnon et al., 2001). Embora sejam utilizados crioprotetores para minimizar o impacto do intenso resfriamento sobre as células, ainda assim há um dano. Neste estudo, foi utilizado o DMSO como crioprotetor, seguindo protocolo descrito por Tirelli e colaboradores (2005) para congelamento de células da granulosa de suínos. (Tirelli et al., 2005) O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente barato, comum e de baixa toxicidade. É também uma molécula pequena e versátil devido ao seu papel na síntese orgânica, encontra-se no estado líquido sobre uma vasta gama de temperaturas, é um doador de elétrons forte e tem uma elevada polaridade (Martin et al., 1967).

O protocolo de criopreservação de Tirelli, emprega na sua forma original o uso de Soro Fetal Bovino. Entretanto, sabemos, com base em estudos prévios (Vireque et al, 2015; Campos et al,

dados não publicados), que o acréscimo de SFB ao meio de cultivo de células de granulosa acarreta na diferenciação destas células no sentido de completar a luteinização. De acordo com estes autores, há um aumento na produção de estradiol e redução da produção de progesterona e relaxina por células da granulosa em meio livre de soro quando comparado às células cultivadas em meio contendo SFB. Inclusive, Vireque et al, também demonstraram que as células da granulosa provenientes de RA, ou seja, células da granulosa-luteínicas já submetidas ao estímulo do hCG, podem restaurar as características morfológicas e estruturais de células não luteinizadas após o cultivo quimicamente definido livre de soro. Para o uso destas células em sistemas de co-cultivo precisamos que as mesmas mantenham um comportamento de fase folicular. Para tanto houve necessidade de testar a interferência do SFB usado no meio de vitrificação, proposto pelo protocolo adotado, com relação ao comportamento funcional das células. Verificamos que não houve interferência deste suplemento quando utilizado somente no meio de criopreservação no processo de diferenciação celular, analisado por morfologia, viabilidade e produção hormonal, viabilizando o emprego do protocolo original, sem necessidade de adaptações.

Do ponto de vista do comportamento celular, Portella e colaboradores (2010) (descrevem que o plaqueamento de menores densidades celulares para cultivo em meio livre de soro propicia a célula a maior secreção de estradiol e uma característica mais compatível com fase folicular (Portella et al., 2010), neste sentido a dificuldade em se obter grande número de células no recuperado levou à cultivos com menores densidades celulares e provavelmente favoreceu o perfil de célula desejado.

Sendo assim, este estudo apresenta uma técnica viável de armazenamento de células de granulosa humana para uso eletivo em sistemas de co-cultivo de oócitos e embriões, a fim de melhorar os resultados reprodutivos em ciclos de fertilização *in vitro*. De acordo com o estudo de Casillas e colaboradores (2014) onde foi testado o co-cultivo de oócitos imaturos de suínos desvitrificados com células da granulosa frescas, observou-se que as células da granulosa em co-cultura com os oócitos parecem se reorganizar e cercar os oócitos em camadas ordenadas e após 44 h são capazes de gerar a matriz extracelular, e notavelmente a maturação desses oócitos aumentou em 49%. Para tanto lembramos que é necessário a manutenção da viabilidade das células da granulosa para que a MIV seja eficiente. Estudos anteriores em oócitos desnudos de bovinos e camundongos

mostraram que o co-cultivo com células do cumulus aumentou a maturação e taxas de fertilização (Zhang et al., 1995; Ge et al., 2008).

Uma das possíveis justificativas para um potencial efeito benéfico do sistema de co-cultivo com granulosa é que a retomada meiotica dos oócitos não é unidirecional a partir das células somáticas para os oócitos, mas bidirecional, portanto a presença das células do cumulus é de grande importância para manter as junções gap e adquirir competência para o desenvolvimento e funções mitocondriais durante a maturação (Wigglesworth et al., 2013). Estes sinais parácrinos das células do cumulus podem aumentar a maturação do oócito (Price & Buratini, 2011). Por exemplo, a retomada meiotica e a capacidade do desenvolvimento do oócito são aumentadas pelos sinais de EGF-L das células da granulosa, o EGF-L é conhecido como um eficiente indutor da retomada meiotica em várias espécies incluindo os suínos. (Prochazka et al., 2003).

Uma das dificuldades encontradas na realização deste estudo esteve relacionada com recuperação de células para cultivo, uma vez que a alta vulnerabilidade dessas células e a baixa recuperação de células a partir do fluido folicular aspirado nos procedimentos de captação de oócitos não permitia a obtenção de concentrações suficientes para plaqueamento das mesmas. Isso acabou levando à exclusão de inúmeras amostras inicialmente incluídas. Por conta disto, incluímos como critério de inclusão que a paciente doadora apresentasse no momento da indicação para captação, ao menos, 8 folículos maiores que 14 mm. Além disso, como o objetivo do estudo era a padronização da técnica, o desenho do estudo exigiu critérios rígidos de inclusão, com objetivo de minimizar o impacto de variáveis individuais das amostras sobre o desfecho, uma vez que a viabilidade e capacidade funcional que foram avaliadas após o descongelamento poderiam ser comprometidas por má qualidade da amostra. Neste sentido poucas eram as pacientes que preenchiam todos os critérios de inclusão.

Outra dificuldade encontrada se referiu à separação das CGs das células sanguíneas presentes no fluido folicular do aspirado, em alguns casos o uso da coluna de histopaque não foi suficiente e a presença de sangue no cultivo foi extremamente prejudicial, demandando a exclusão destas culturas. Além de contaminações pontuais no cultivo, algumas provavelmente provenientes da

própria paciente doadora, outras mais tardias, provavelmente ambientais ou secundárias à manipulação.

Sendo assim, há necessidade de ressaltar que este é o primeiro relato de protocolo de criopreservação de células da granulosa humana, com manutenção da capacidade funcional da células e com células que, apesar de recuperadas após o estímulo do hCG, mantem comportamento de células de fase folicular. Existem, de fato, algumas limitações neste estudo. A baixa recuperação de células frescas após o cultivo não permitiu a contagem pré-congelamento, apenas após o descongelamento pré-cultivo, portanto não sabemos quantas células viáveis efetivamente foram congeladas no experimento 2C.

A criopreservação promove a morte de parte da população de células da granulosa congeladas mesmo na presença de crioprotetor, entretanto, a viabilidade, capacidade funcional e a morfologia das células viáveis recuperadas, ficam preservadas. Portanto neste estudo foi apresentado um protocolo eficiente de congelamento de células de granulosa humana obtidas a partir do fluido folicular de pacientes submetidas à procedimento de Fertilização *in vitro*. A criopreservação das CGs humanas seguida de cultivo em meio livre de soro permite a diferenciação de células com comportamento funcional de fase folicular, com predominância na produção ascendente de estradiol e aumento progressivo da relação Estradiol/Progesterona e o uso de soro fetal bovino no meio de criopreservação das CG humanas não interferiu no comportamento das células em cultivo após o descongelamento.

Referências

- Abdel-Ghania MA, Shimizu T, Asano T, Suzuki H. *In vitro* maturation of canine oocytes co-cultured with bovine and canine granulosa cell monolayers. **Theriogenology** 2012; 77: 347–355.
- Adeldust H., Zeinoaldini S., Kohram H., Roudbar MA., Joupari MD. In vitro maturation of ovine oocyte in a modified granulosa cells co-culture system and alpha-tocopherol supplementation: effects on nuclear maturation and cleavage. **Journal of Animal Science and Technology** (2015) 57:27.
- Amsterdam, A. & Rotmensch, S. Structure-function relationships during granulosa celldifferentiation. *Endocrine reviews* (1987) 8, 309-337.
- Ancioto KL, Vantini R, Garcia LM, Mingoti GZ. Influência das células do cumulus e do meio de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. **Acta Scientiae Veterinariae**. 2004;32:118.
- Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. **Hum Reprod Update** 2001; 7(4): 394-403.
- Barrett SL., Woodruff TK. Gamete preservation. **Cancer Treat Res**.2010;156:25-39.
- Buratini J., Price CA. Follicular somatic cell factors and follicle development. **Reprod Fertil Dev**. 2011;23(1):32-9
- Campos CO, Bernuci MP, Vireque AA, Campos JR, Silva-de-Sá MF, Jamur MC, Rosa-e-Silva ACJS. Preventing Microbial Contamination during Long-TermIn VitroCulture of Human Granulosa-Lutein Cells: An UltrastructuralAnalysis. **Obstetrics and Gynecology**. 2012. Pages 152781.
- Campos CO, Vireque AA, Bernuci MP, Campos JR, Sá MFS, Ferriani RA, Jamur MC, Rosa-e-Silva ACJS. Human granulosa cells display ultrastructural and functional characteristics of non-luteinized cells after culture in a serum-free chemically defined medium. 2014. Tese de mestrado - dados submetidos à publicação.
- Campos JR., Rosa-e-Silva JC., Carvalho BR., Vireque AA., Silva-de-Sá MF., Rosa-e-Silva AC. Cryopreservation time does not decrease follicular viability in ovarian tissue frozen for fertility preservation. **Clinics** (São Paulo) 2011a; 66(12):2093-2097.
- Campos JR., Ting AY., Yeoman RR., Lawson MS., Rosa-e-Silva ACJS., Zelinski MB. Cryopreservation of isolated secondary follicles from nonhuman primate using a closed system and quartz capillaries. **J Assist Reprod Genet** 2011b; 28:997–8.
- Casillas F, Teteltitla-Silvestre M, Ducolomb Y, Lemus AE, Salazar Z, Casas E, Betancourt M.Co-culture with granulosa cells improve the in vitro maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock, **Cryobiology** 69 (2014) 299–304.
- Cobo A., Garcia-Velasco JA., Domingo J., Remohí J., Pellicer A. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? **Fertil Steril**. 2013;99:1485–95.
- David A., Van Langendonckt A., Gilliaux S., Dolmans MM., Donnez J., Amorim CA. Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of Kit ligand and anti-mullerian hormone in human ovarian tissue. **Hum Reprod**. 2012;27:1088–95.

Demirci B., Lornage J., Salle B., Frappart L., Franck M., Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. **Fertil Steril**. 2001;75(4):754-762.

Donnez J., Martinez-Madrid B., Jadoul P., Van Langendonck A., Demylle D., Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Hum Reprod Update**. 2006;12:519-35.

Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. **Hum Reproduction** 2012; 18: 536-554.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause, **Hum. Reprod.** 1992; 7:1342-1346.

Feng G., Shi D., Yang S., Wang X. Co-culture embedded in cumulus clumps promotes maturation of denuded oocytes and reconstructs gap junctions between oocytes and cumulus cells. *Zygote* 21 (August), pp. 231-237. C _ **Cambridge University Press** 2012

Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca 2008: 303-327.

Ge L, Sui HS, Lan GC, Liu N, Wang JZ, Tan JH. Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events, **Fertil. Steril**. 90 (2008) 2376-2388.

Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**. 2004;82-83:431-46.

Goovaerts IG., Leroy JL., Rizos D., Bermejo-Alvarez P., Gutierrez-Adan A., Jorssen EP., Bols PE. Single in vitro bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. **Theriogenology**. 2011 Oct 15;76(7):1293-303.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular estrogen synthesis: the 'two-cell, two- gonadotrophin' model revisited. **Mol Cell Endocrinol**, v.100, n.1-2, Apr, p.51-4. 1994.

Khatir H, Anouassi A, Tibary A. Production of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos by IVM and IVF and coculture with oviductal or granulosa cells. **Theriogenology** 2004; 62:1175-85.

Kim SS, Battaglia DE, Soules MR. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. **Fertil Steril** 2001; 75(6): 1049-56.

Kleinhans FW, Mazur P. Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest. **Cryobiology** 2007; 54:212-222.

Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**. 2007 Jan 1;67(1):73-80.

Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **J Clin Oncol** 2006; 24:2917-2931.

- Li Z. et al. A co-culture system with preantral follicular granulosa cells in vitro induces meiotic maturation of immature oocytes. **Histochem Cell Biol** 2011; v.135, n.5, May, p.513-22.
- Maeda J, Negami A, Kimtani N, Tominaga T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. **Biol Reprod** 1996;54:930–6.
- Martin, D., Weise, A., Niclas, H. J. The Solvent Dimethyl Sulfoxide. **Angew. Chem., Int. Ed. Engl.** 1967, 6, 318.
- Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **J Gen Physiol** 1963;47:347–369.
- Mochizuki H, Fukui Y, Ono H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. **Theriogenology** 1991; 36:973– 86.
- Nottola S.A, Heyn R, Camboni A, Correr S, Macchiarelli G. Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization. **Stefania -Microscopy Research and Technique** 2006; 69:508–516.
- Oktay K, Sonmezer M. Chemotherapy and amenorrhea: Risks and treatment options, **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.** 2008; 20:408–415.
- Portela VM., Zamberlam G., Price CA. Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. **Fertil Steril.** 2010 Apr;93(6):2050-5.
- Prochazka R, Kalab P, Nagyova E. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro, **Biol. Reprod.** 68 (2003) 797–803.
- Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiaer E, Kjeldsen L, Andersen MK, Andersen CY. Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia, **Fertil. Steril.** 2010; 94:2186–2190.
- Schmidt KT, Larsen EC, Andersen CY, Andersen AN. Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease, **BJOG** 2010;117:163–174.
- Schramm BD, Bavister RD. Effects of granulosa cells and gonadotrophins on meiotic and developmental competence of oocytes in vitro in non-stimulated rhesus monkeys. **Hum Reprod** 1995; 10:887–95.
- Sharma R., Kattoor AJ., Ghulmiyyah J., Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. **Syst Biol Reprod Med.** 2015 Jan;61(1):1-12.
- Sluss PM., Lee K., Mattox JH., Smith PC., Graham MC., Partridge AB. Estradiol and progesterone production by cultured granulosa cells cryopreserved from in vitro fertilization patients. **Eur J Endocrinol** 1994;130:259–64.
- Smitz JEJ, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction** 2002; 123:185-202.
- Staigmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Res** 1984;9:221–9.

- Stoop D, Cobo A, Silber S. Fertility preservation 3. Fertility preservation for age-related fertility decline. **Lancet** 2014; 384: 1311–19.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum Reprod Update**. 2003; 9(1):35-48.
- Tagler D, Tu T, Smith RM., Anderson NR., Tingen CM., Woodruff TK, Shea LD. Embryonic Fibroblasts Enable the Culture of Primary Ovarian Follicles Within Alginate Hydrogels. **Tissue Engineering**, 2012; v 18, n.11 e 12.
- Teotia A, Sharma GT, Majumdar AC. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayers. **Small Reprod Res** 2001;40:165–77.
- Tilly JL., Kowalski KI., Schomberg DW., Hsueh AJW. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. **Endocrinology** 1992; 131:1670-1676.
- Ting AY., Yeoman RR., Lawson MS., Zelinski MB. *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Hum Reprod** 2011;26:2461–72.
- Tirelli M. Basini G , Grasselli F, Bianco F, Tamanini C. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. **Domestic Animal Endocrinology** 28 (2005) 17–33.
- Tsafirri A., Braw RH. Experimental approaches to atresia in mammals. In: Clarke JR (ed.), **Oxford Reviews of Reproductive Biology**. Oxford: Clarendon Press; 1984: 226-265.
- Vireque AA, Campos JR, Dentillo DB, Bernuci MP, Campos CO, Sá MFS, Ferriani RA, Nunes AA, Rosa-e-Silva ACJS. Driving human granulosa-luteal cells recovered from in vitro fertilization cycles toward follicular phase phenotype. 2014. **Reprod Sci**.2015 Aug;22(8):1015-27.
- Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause, **PLoS ONE** 2010;5: e8772.
- Wigglesworth K, Lee KB, MJ OB, Peng J, Matzuk MM, Eppig JJ. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 110 (2013) 723–729.
- Yoon JD., Jeon Y., Cai L., Hwang SU., Kim E., Lee E., Kim DY., Hyun SH. Effects of coculture with cumulus-derived somatic cells on in vitro maturation of porcine oocytes. **Theriogenology** 83 (2015) 294–305.
- Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro, **Mol. Reprod. Dev.** 40 (1995) 338–344.