



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo original

Cultura de células da granulosa humanas com fenótipo de fase folicular: influência do sistema quimicamente definido na morfologia, ultraestrutura, secreção de esteroides e relaxina[☆]

Alessandra Aparecida Vireque^a, Jacira Ribeiro Campos^a, Carolina Oliveira Campos^a, Marcelo Picinin Bernuci^a, Maria Célia Jamur^b, Rui Alberto Ferriani^a, Marcos Felipe Silva de Sá^a e Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva^{a,*}

^a Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 19 de novembro de 2012

Aceito em 14 de dezembro de 2012

On-line em 5 de dezembro de 2013

Palavras-chave:

Células da granulosa
Sistema quimicamente definido
Luteinização
Ultraestrutura
Esteroides
Relaxina
Maturação *in vitro*
Técnicas de reprodução assistida

R E S U M O

Está bem descrito na literatura o padrão de cultivo de células da granulosa (CG) humanas que perpetua a luteinização, simulando a fase lútea do ciclo. Nesse sistema, há redução na secreção de estradiol (E2) e aumento na síntese de progesterona (P4) e relaxina (RLN). Objetivamos padronizar um sistema de cultura livre de soro, com o intuito de reverter o processo de luteinização de CG obtidas em ciclos de fertilização *in vitro* (FIV), pré-luteinizadas pela gonadotrofina coriônica humana (hCG), para aplicação na maturação *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais. Foi feito estudo experimental com GC obtidas de 10 mulheres em tratamento de reprodução assistida. As CG foram cultivadas em α -MEM contendo IGF-I, ITS, androstenediona, PVP-40 (meio quimicamente definido) ou TCM-199 contendo FSH/soro. Após 48, 96 e 144 horas, foram avaliados: morfologia das culturas, produção de E2, P4 (Quimioluminescência/Immulate), RLN (Elisa) e ultraestrutura (Microscopia Eletrônica). Os dados foram analisados por Anova e regressão linear com efeitos mistos (SAS versão 9.0). Células cultivadas em α -MEM apresentam alta capacidade estrogênica e padrão de produção hormonal característico da fase folicular, mantendo características morfológicas/ultraestruturais semelhantes a células *in vivo*. No sistema de cultura padronizado, as CG não completam *in vitro* o processo de luteinização deflagrado pela hCG, assumindo fenótipo de fase folicular.

© 2012 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.
Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

[☆] Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: anasars@fmrp.usp.br (A.C.J.d.S. Rosa e Silva).

Culture of human granulosa cells with follicular phase phenotype: influence of chemically defined system on morphology, ultrastructure, secretion of steroids and relaxin

A B S T R A C T

Keywords:

Granulosa cells
Chemically defined system
Luteinization
Ultrastructure
Steroids
Relaxin
In vitro maturation
Assisted reproduction techniques

It is well described in the literature the granulosa cells (GC) culture pattern that perpetuates human luteinizing simulating the luteal phase of the cycle. In this system, there is a reduction in the secretion of estradiol (E2) and increased synthesis of progesterone (P4) and relaxin (RLN). We aim to standardize a serum-free culture system, in order to reverse the luteinization process of GC obtained in IVF cycles, pre-luteinized by hCG, for use in *in vitro* maturation of preantral ovarian follicles. An experimental study was conducted with GC obtained from 10 women undergoing treatment for assisted reproduction. The GC were cultured in α -MEM containing IGF-I, STI, androstenedione, PVP-40 (chemically defined medium) or TCM-199 containing FSH/serum. After 48, 96 and 144 h were analyzed: culture morphology, concentrations of E2, P4 (Chemiluminescence/Immulate), and RLN (Elisa), and ultrastructure (Electron Microscopy). Data were analyzed by Anova and linear mixed-effects regression (SAS version 9.0). Cells cultured in α -MEM present estrogenic capacity and pattern of hormone production characteristic of the follicular phase, maintaining morphological/ultrastructural features similar that *in vivo* cell. In standard culture system, the CG not completes *in vitro* luteinization process triggered by hCG, assuming follicular phase phenotype.

© 2012 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

Introdução

As células da granulosa (CG) sofrem profundas alterações morfológicas e funcionais ao longo do desenvolvimento folicular devido à complexa dinâmica do folículo e apresentam distintos graus de diferenciação de acordo com sua localização folicular, estágio de crescimento do folículo ovariano e também de acordo com a fase do ciclo menstrual. Os primeiros eventos de diferenciação das CG durante o desenvolvimento folicular incluem mobilização de colesterol (COL), reorganização do complexo de Golgi, lisossomos, gotas lipídicas e retículo endoplasmático liso e rugoso,^{1,2} os quais promovem o transporte e o armazenamento intracelular do COL para sua conversão a hormônios esteroides.¹

Essas mudanças ultraestruturais são acompanhadas pela expressão das enzimas P450 aromatase e P450 scc.³ Os últimos eventos associam-se diretamente ao estabelecimento do processo de esteroidogênese e consistem em mudanças estáveis na estrutura e na forma das CG (forma poliédrica, com baixa razão citoplasma/núcleo), formação abundante de junções do tipo Gap e formação de cristas trabeculares dispostas nas mitocôndrias.^{2,4}

Após a ovulação, as CG do folículo pré-ovulatório transformam-se em CG luteínicas, originando o corpo lúteo. Essas células tornam-se hipertrofiadas, sofrem modificações ultraestruturais e secretam grandes quantidades de progesterona, típicas da fase lútea do ciclo. As CG luteínicas apresentam ultraestrutura típica de células esteroidogênicas, com retículo endoplasmático liso abundante, mitocôndrias com cristas tubulares, ribossomos, acúmulo de numerosas gotas lipídicas contendo ésteres de colesterol no citoplasma, superfície celular com numerosas expansões e protuberâncias.⁵ Além de haver um rearranjo do citoesqueleto, há uma diminuição das junções Gap.^{6,7}

Culturas de células da granulosa têm sido rotineiramente usadas para estudo da diferenciação *in vitro* de células ovarianas e para aplicações na tecnologia de reprodução assistida (TRA) como suporte para a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e cultivo embrionário.⁸ Contudo, os sistemas de cultura de CG desenvolvidos nas últimas duas décadas têm sido caracterizados por um consistente declínio na produção de estradiol com o tempo de cultura,^{9,10} enquanto a síntese de progesterona aumenta, sugerindo início de luteinização. Além disso, as CG só respondem a concentrações farmacológicas de FSH.

Quanto à suplementação proteica nesses sistemas de cultura, a prática usual tem sido a adição de soro ao meio. Como o soro promove a adesão das CG à superfície da placa de cultura, vários estudos usam o soro recobrimo a placa de cultura antes de semear as células, adicionando-o ao meio nas primeiras horas de cultivo ou durante todo o período em baixas concentrações.¹¹⁻¹⁴ Células da granulosa humanas obtidas nos ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) e cultivadas em meio suplementado com soro têm mostrado luteinização em cultura¹⁴ e, consequentemente, têm sido usadas como modelo para simular células granulosas luteínicas, do corpo lúteo.¹⁵ Vale ressaltar que a obtenção dessas células é feita após o uso do hCG para simulação do pico de LH e indução da maturação oocitária. A produção endócrina dessas culturas, portanto, é característica da segunda fase do ciclo e não pode ser comparada à função endócrina da fase folicular.

Sistemas de cultura de CG livres de soro foram descritos pela primeira vez por Campbell e Webb em 1996 com CG ovinas¹⁶ e, posteriormente, CG bovinas.¹³ Nesses sistemas de cultura a produção de estradiol pode ser induzida e mantida em resposta a concentrações fisiológicas de FSH, IGF-I e/ou insulina com aumento das respostas proliferativa e estrogênica até 144 horas de cultura. Além da capacidade estrogênica das CG e do padrão normal de produção hormonal característico da fase folicular do ciclo, as CG mantêm

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3969844>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3969844>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)