

Avaliação da segurança da utilização do corante Azul Cresil Brilhante em modelo de cultura primária de células foliculares

Vânia dos Reis, Helena von Eye Corleta

Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS

Introdução

A seleção de oócitos destinados à maturação *in vitro* (MIV) baseia-se na morfologia do complexo *cumulus*-oócito, apesar de este método não ser preciso. Desta forma, técnicas não invasivas de seleção de oócitos estão sendo desenvolvidas, sendo uma delas baseada na utilização do corante Azul Cresil Brilhante (BCB), já consolidada em espécies animais, mas não em humanos. Visto que a utilização de oócitos humanos para pesquisa é restrita e que as células murais da granulosa (GC) e do *cumulus oophorus* (CC) apresentam íntima relação com o oócito, a utilização do BCB nestas células permite elucidar, de forma indireta, o possível efeito do BCB sobre oócitos humanos e indicar o protocolo de aplicação do BCB considerado mais seguro. Assim, este estudo avaliou a viabilidade das GCs e CCs expostas a diferentes protocolos de aplicação do BCB.

Métodos & Resultados

GCs e CCs foram coletadas de 24 pacientes submetidas a punção ovariana, cultivadas separadamente por 48 horas e expostas a diferentes protocolos de aplicação do BCB. A fim de avaliar o efeito dos tratamentos, ensaios de proliferação (contagem celular com azul de tripan) e de viabilidade celular (ensaio de MTT) foram realizados após mais 48 horas de cultivo.

Para avaliar o melhor diluente a ser utilizado com o BCB as células foram expostas a DMEM com vermelho fenol (controle), DMEM sem vermelho fenol, DPBS ou DPBS modificado (mDPBS), por 60 minutos.

Tabela 1: Resultados da contagem celular e MTT entre grupos tratados com diferentes diluentes

	GCs		CCs	
	Cell counter	MTT	Cell counter	MTT
DMEM with phenol red	3.96 ± 1.09	0.070 ± 0.007	1.68 ± 0.20	0.085 ± 0.009
DMEM without phenol red	3.56 ± 0.86	0.073 ± 0.006	1.58 ± 0.25	0.085 ± 0.007
DPBS	3.83 ± 0.95 ^a	0.081 ± 0.007	1.65 ± 0.23	0.090 ± 0.008
modifiedDPBS	4.29 ± 0.96	0.078 ± 0.006	1.79 ± 0.37	0.087 ± 0.10

^a different from mDPBS.

Não houve diferença na viabilidade e proliferação celular dos grupos em relação ao controle (Tabela 1).

Para o segundo experimento, GCs e CCs foram expostas a diferentes concentrações de BCB (13, 20 ou 26 µM) por 60 minutos, utilizando o diluente mDPBS, a fim de avaliar a concentração mais segura.

Tabela 2: Resultados da contagem celular e MTT entre grupos tratados com diferentes concentrações de BCB

	GCs		CCs	
	Cell Counter	MTT	Cell conter	MTT
DMEM with phenol red	3.36 ± 0.58	0.052 ± 0.006	5.49 ± 1.02	0.088 ± 0.011 ^a
BCB 13 µM in mDPBS	3.48 ± 0.80	0.051 ± 0.006	5.79 ± 1.02	0.073 ± 0.006
BCB 20 µM in mDPBS	3.50 ± 0.72	0.046 ± 0.004	5.15 ± 0.82	0.067 ± 0.006
BCB 26 µM in mDPBS	2.99 ± 0.67	0.042 ± 0.003 ^a	4.67 ± 0.56 ^b	0.067 ± 0.006

^a different from DMEM with phenol red and BCB 13 µM.

^b different from BCB 13 µM.

^c different from BCB 20 µM and BCB 26 µM.

As células tratadas com 20 µM e 26 µM apresentaram menor viabilidade e proliferação em relação ao grupo controle (Tabela 2). Sendo assim, a concentração de 13 µM foi utilizada na avaliação da exposição das células ao BCB nos tempos 60, 90 e 120 minutos. O tempo 60 minutos demonstrou não afetar a viabilidade e a proliferação celular em relação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados da contagem celular e MTT entre grupos tratados com diferentes tempos de exposição ao BCB

	GCs		CCs	
	Cell counter	MTT	Cell counter	MTT
DMEM with phenol red	10.828 ± 1.26	0.0713 ± 0.003	10.057 ± 1.33	0.095 ± 0.009
60 minutes	9.823 ± 1.01	0.0711 ± 0.003	10.411 ± 1.65	0.087 ± 0.008
90 minutes	8.041 ± 1.02 ^a	0.0722 ± 0.003	9.843 ± 1.39	0.085 ± 0.008 ^b
120 minutes	9.676 ± 1.20	0.0696 ± 0.003	7.09 ± 1.16 ^a	0.084 ± 0.008

^a different from DMEM with phenol red and 60 min.

^b different from DMEM with phenol red

Conclusão

A viabilidade e a proliferação das células foliculares não foram comprometidas, quando expostas ao BCB 13 µM diluído em mDPBS por 60 minutos, demonstrando a segurança da aplicação deste protocolo, e levantando a hipótese de que sua aplicação não irá interferir com a qualidade de oócitos humanos.

Financiamento: CNPq e FIPES - HCPA

