



Protocolo – Coleta e Cultivo de GOCs

Preparo dos meios:

- Aquecer o meio α -MEM-HEPES+BSA (0,01%) – (utilizado para digestão e para manter os GOCs selecionados) 5 ml por coleta;
- Preparar o Meio de cultivo conforme tabela abaixo;
- Preparar a pipeta siliconizada.

Meio para coleta (2 ml por digestão):

- 200 μ l de colagenase ([estoque] = 1 mg/ml, [final] = 100 μ g/ml, diluição 1:100)
 - 2 μ l de DNase I ([estoque] = 10 mg/ml, [final] = 10 μ g/ml, diluição 1:1000)
 - 1798 μ l de α -MEM-HEPES+BSA(0,01%) ou Tryple
- Primeiro deve aquecer α -MEM-HEPES na estufa de secagem por 1hr e no momento da coleta adicionar as enzimas.
 - Siliconizar ponteira para coleta de GOCs – solução de 5% de Tween 20 diluída em H₂O. Lavar a Pasteur com a solução e depois com o meio α -MEM-HEPES + BSA (0,01%).

- Colocar o meio de coleta em uma placa de 35 mm;
- Transferir os ovários limpos (sem gordura) para a placa, e então rompe-los em pedaços com agulha e pinça para a liberação dos GOCs. Após isso, inserir o meio na placa.
- Coletar os GOCs e os oócitos e transferi-los para outra placa contendo 2 ml de meio α -MEM-HEPES + BSA (0,01%).
- Homogeneizar o meio a cada 2 ou 3 min com uma P1000 e coletar nos intervalos. Repetir isto por no máximo 20 min.

*Meio com HEPES deve ser aquecido na estufa, nunca na incubadora.

*Meio com NaHCO₃ sempre deve ser aquecido aberto na incubadora.

Meio para cultivo

	Para 1 ml	Para 2 ml	Para 3 ml
α -MEM-NaHCO ₃	978 μ l	1956 μ l	2934 μ l
P/S (100x)	10 μ l	20 μ l	30 μ l
ITS (100x)	10 μ l	20 μ l	30 μ l
FSH (10 mIU/ml)	1 μ l	2 μ l	3 μ l
Cilostamida (10 mM)	1 μ l	2 μ l	3 μ l
BSA (10%)	1 μ l	2 μ l	3 μ l
GDF9 (100 mg/ml)			

* MEM + P/S + ITS pode ser armazenado de um dia para o outro, porem não pode conter FSH nem cilostamida. Estes devem ser colocados quando for utilizar o meio.

- Filtrar o meio;
- Aquecer o meio por 4hr na incubadora;

- Adicionar 500 ul em cada poço da placa;
- Inserir o inserto de colágeno e adicionar mais 250 ul em cima do inserto.
- Colocar os GOCs;
- Trocar 100% do meio a cada 3 dias. Inserir 750ul de meio em outro poço e então transferir o inserto com os GOCs para este poço.

Locais dos reagentes

Colagenase (cod C0130), DNase - no freezer com tranca

FSH – alíquotas na gaveta 3 do freezer com tranca

Cilostamida, P/S e BSA(10%) – Alíquotas na gaveta 5 do freezer com tranca

α -MEM - geladeira