

043 - INFLUÊNCIA DA TRANSFEÇÃO E SELEÇÃO NA SENESCÊNCIA DO CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS DA GRANULOSA TRANSGÊNICAS (The influence of transfection and selection in senescence of transgenic granulosa cells cultivated *in vitro*)

Paulini, F.¹; Oliveira, G.S.²; Moura, M.T.³; Araújo, V.G.B.⁴; Rua, P.J.S.⁵; Franco, M.M.⁶; Rumpf, R.⁶; Melo, E.O.⁷

O crescimento e o desenvolvimento das células somáticas e germinativas do folículo ovariano ocorrem de uma maneira mutuamente dependente e coordenada, no qual camadas de células da teca e granulosa que cercam o ovócito são formadas e desenvolvidas durante o crescimento folicular. Os sistemas de cultivo de células da granulosa vêm se desenvolvendo com o intuito de investigar a fisiologia dos processos de crescimento e diferenciação que ocorrem *in vivo* no folículo ovariano. Em tais sistemas, é conhecido o fato de que as células mantêm a forma esférica, característica da parede do folículo e se organizam em grumos, semelhantes às células fibroblásticas. Processos como transfecção e uso de antibioticoterapia podem acelerar o processo natural de senescência de células primárias em cultivo *in vitro*, acarretando perdas precoces do cultivo. O objetivo desse trabalho foi verificar a interferência da transfecção e seleção com antibióticos na senescência das células da granulosa bovinas em sistemas de cultivo *in vitro*. Ovários obtidos de abatedouro foram puncionados com seringa de 10 mL para obtenção do fluido folicular contendo as células. Os ovócitos foram retirados e o líquido centrifugado. O *pellet* foi lavado com PBS e as células cultivadas em meio DMEM. Uma vez o cultivo primário estabelecido, a garrafa foi repicada para placa de 24 poços até a obtenção de 80% de confluência, no qual as células foram transfectadas com o vetor pCi-Neo, contendo o gene repórter β -Galactosidase e o gene que confere resistência ao antibiótico G418. Após 48 horas as células foram transferidas para garrafas de cultivo com DMEM acrescido de 500mg/mL do antibiótico G418, para seleção das células transgênicas. O sucesso da transfecção foi avaliado por meio da detecção da atividade do gene repórter. Células não transfectadas selecionadas com G418 e células transfectadas e cultivadas sem G418 foram usadas como controles do experimento. Passados 20 dias, todas as células da garrafa controle selecionadas com G418 haviam morrido, indicando o término da seleção. É conhecido que a etapa mitótica cessa na senescência celular na qual há o encurtamento dos telômeros das células, resultando em divisões celulares finitas. Além do aspecto proliferativo, as células senescentes em cultura são maiores e achatadas, o que é acompanhado pela deficiência das células em replicar seu DNA sob estímulos de crescimento. A senescência envolve perdas progressivas e irreversíveis das funções celulares, o que aumenta a probabilidade de morte. Entretanto, os resultados observados nesse estudo indicam que a senescência não foi estimulada ou induzida nas células da granulosa pela transfecção e seleção com G418 e sim pela multiplicação natural das células.

Apoio: EMBRAPA, CNPq, IFS.

¹Méd. Vet., mestranda, Universidade de Brasília-UnB

²Biologia, graduanda, Universidade de Brasília-UnB

³Biólogo, doutorando, Universidade de Brasília-UnB

⁴Biologia, graduando, Universidade de Brasília-UnB

⁵Biotecnólogo, mestrando, Universidade Federal de Uberlândia- UFU

⁶Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁷Biólogo, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia