

# PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DE FIBROBLASTOS NA FASE G<sub>2</sub>/M DO CICLO CELULAR

Zappe, Igor G.<sup>1\*</sup>, Pasqual, Bruno M.<sup>1</sup>, Della Méa, Ricardo<sup>1</sup>, Amaral, Carolina S.<sup>1</sup>, Macedo, Mariana P.<sup>2</sup>, Rissi, Vitor B.<sup>2</sup>, Gonçalves, Paulo B. D.<sup>3</sup>;

1. Estudante de IC da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM; \*zappe.igor@gmail.com

2. Aluno de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

3. Professor Orientador da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Palavras Chave: Sincronização, CDK1, RO3306.

## Introdução

A coordenação do ciclo celular é importante para investigar interações núcleo-citoplásmicas em estudos onde se realiza fusão ou transferência nuclear. Entretanto não existem protocolos confiáveis que resultam em altas taxas de células sincronizadas na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular durante o cultivo *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de um inibidor de CDK1 (RO3306) para sincronizar fibroblastos na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular.

## Resultados e Discussão

Fibroblastos suínos foram mantidos em cultivo até atingirem a confluência e então utilizados para preparar cultivos não confluentes adicionando 5x10<sup>4</sup> células em placas de 6 poços, o que resultou em uma densidade não confluenta de células. Uma densidade de células não confluenta a partir de um cultivo mantido em confluência permite uma onda sincronizada de células progredindo pelas fases S e G<sub>2</sub>/M do ciclo celular. As células foram então fixadas para análise do ciclo celular as 0, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 horas pós-passagem. Foi observado que mais de 30% das células progrediram até a fase G<sub>2</sub>/M entre 24 e 28 horas após a passagem a partir de um cultivo confluenta (FIG. 1)

Baseado nestes resultados foram testadas duas doses (5µM e 9µM) do RO3306 iniciando o tratamento as 16 ou 20 horas pós-passagem a partir de cultivos confluentes. As células foram fixadas para análise do ciclo celular às 24, 28, 32, 36 e 40 horas pós-passagem. Para análise do ciclo celular, as células foram tripsinizadas e ressuspensas e fixadas. Posteriormente, as células fixadas foram coradas com 50µg de iodeto de propídio e 100µg de RNase. A quantidade de DNA de 10.000 células por amostra foi determinada por citometria de fluxo, utilizando o citômetro FACSVerse (BD Biosciences). As porcentagens de células em G<sub>1-0</sub>, S e G<sub>2</sub>/M foram calculadas utilizando o FACSSuite Software.

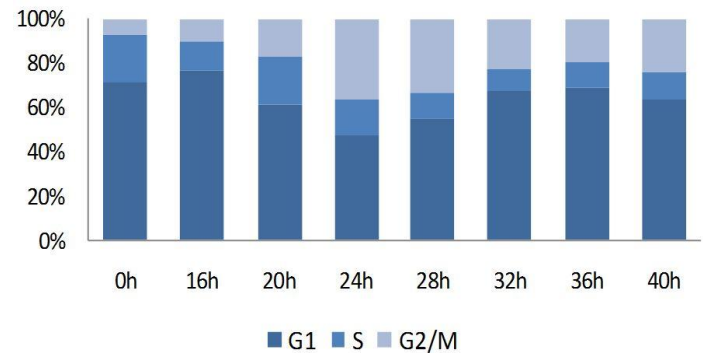
Quando o tratamento iniciou as 16h pós-passagem, a maior proporção de células na fase G<sub>2</sub>/M (41,9%) foi obtida no grupo exposto a 5µM de RO3306 até as 32h, o qual foi significativamente maior do que o grupo controle no mesmo tempo (22,2%). Quando o tratamento iniciou as 20 horas pós-passagem, as maiores porcentagens de células na fase G<sub>2</sub>/M foram obtidas nos grupos tratados com 9µM de RO3306 e fixadas as 36h (61,7%) e 40h (56,1%) pós-passagem.

O diâmetro das células que estavam em diferentes fases do ciclo celular foi determinado em células tratadas com 9µM de RO3306 e fixadas as 36 ou 40h pós-passagem. O diâmetro médio das células em G<sub>1-0</sub> e G<sub>2</sub>/M foi de 13,9 µm e 25,9 µm, respectivamente.

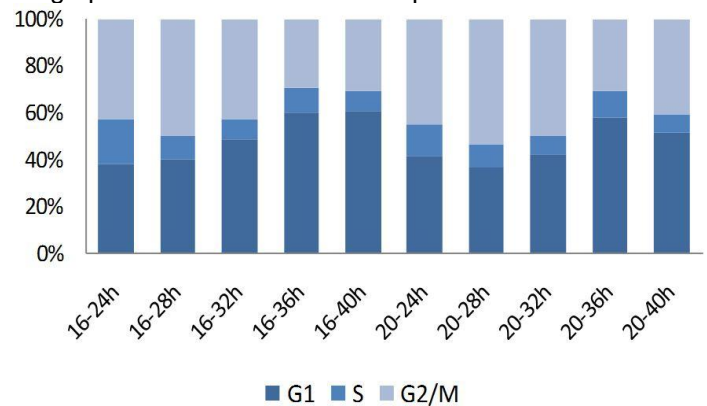
## Conclusões

Nossos resultados proporcionam uma metodologia confiável baseada na inibição da CDK1 e diâmetro celular para obtenção de células na fase G<sub>2</sub>/M.

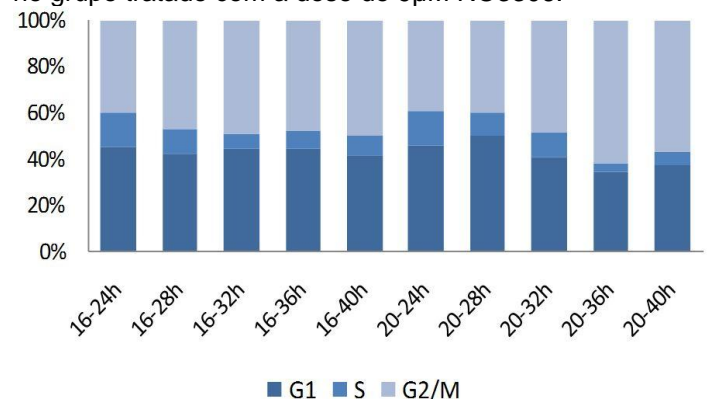
**Figura 1.** Diferentes fases celulares em função do tempo no grupo controle.



**Figura 2.** Diferentes fases celulares em função do tempo no grupo tratado com a dose de 5µM RO3306.



**Figura 3.** Diferentes fases celulares em função do tempo no grupo tratado com a dose de 9µM RO3306.



## Agradecimentos

Agradeço à FAPERGS pela bolsa, à Coordenação de Iniciação Científica da UFSM pela oportunidade, ao Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BIOREP) pelo aprendizado e a todos amigos e familiares pelo apoio.