

Trichostatina na produção de embriões clones bovinos geneticamente modificados

L.S.A. Camargo^{1,2}, C.C.R Quintão¹, L.T. Iguma¹, L.G.B Siqueira¹, B.C. Carvalho¹, J.H.M.Viana¹

¹Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Palavras-chave: bovinos, clonagem, transgênese.

A transferência nuclear com células somáticas (TNCS) tem sido apontada como uma alternativa para se produzir animais geneticamente modificados, pois permite o uso de células somáticas transfectadas e cultivadas por muitas passagens, necessárias para a seleção e o estabelecimento de linhagens celulares geneticamente modificadas. Contudo, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na reprogramação nuclear ainda são pouco entendidos, refletindo na baixa eficiência da TNCS em produzir animais saudáveis. Além disso, o cultivo celular prolongado, requerido para o estabelecimento de linhagens de células geneticamente modificadas, leva a senescência e pode dificultar a reprogramação nuclear (Banito *et al.*, 2009. *Genes and Development* 23:2134-2139; Tat *et al.*, 2011. *Cell Reprogramming* 13:331-344) e a produção de embriões de qualidade por TNCS (Jang *et al.* 2004. *Theriogenology* 62:512-521), apesar de animais clones já terem nascido de células cultivadas por longas passagens (Kubota *et al.* 2000. *PNAS* 97:990-995). A modulação da reprogramação nuclear por agentes químicos, como inibidores de histona deacetilase e inibidores de metilação tem sido avaliada nos últimos anos e pode ser útil para células de difícil reprogramação. Um dos inibidores de histona deacetilase que tem sido avaliado é a Tricostatina A, mas os resultados são controversos. Estudos mostraram que o tratamento de zigotos clones com 50 nM deste agente pode aumentar a produção de blastocistos bovinos (Lee *et al.*, 2011. *J. Reprod. Dev.* 57: 34-42; Sawai *et al.*, 2012. *J. Reprod. Dev.* No prelo), porém esse resultado não se repetiu em outros estudos (Cui *et al.*, 2011. *Cell Reprogramming* 13: 179-189; Sangalli *et al.*, 2012. *Cell Reprogramming* 14: 1-13), os quais também não observaram incremento nas taxas de gestação e de nascimento. Em estudo prévio, observamos que o tratamento com tricostatina em zigotos clones não melhorou a taxa de blastocisto, mas reduziu a incidência de apoptose e possibilitou o nascimento de um animal (Camargo *et al.*, 2011. *Acta Sci. Vet.* 39[Supl.]:S442), contudo, alterações na expressão de genes importantes para o desenvolvimento, como IGF2r e HMG1, foram encontrados nos blastocistos, sugerindo que a reprogramação não ocorreu com sucesso completo (Camargo *et al.*, 2012. *Reprod. Fert. Dev.* 24 :121-122). Mais recente, estudando o efeito da tricostatina em zigotos clones reconstruídos com células geneticamente modificadas após longo cultivo (12 passagens), observamos uma melhora significativa na produção de blastocistos (10,3±3,6% vs 26,7±3,8% para controle [zigotos não tratados] e zigotos tratados com 50 nM tricostatina, respectivamente; dados não publicados), ao contrário do observado anteriormente com zigotos reconstruídos com células não transgênicas e com baixo número de passagens (4-6 passagens). O uso da tricostatina não interferiu na expressão do gene repórter (GFP). Este resultado positivo com células doadoras transgênicas pode ser devido a um efeito da tricostatina sobre o zigoto reconstruído com células cultivadas pelo longo período necessário para se estabelecer a linhagem transgênica. Portanto, o efeito da tricostatina pode ser efetivo em zigotos clones reconstruído com células de difícil reprogramação, como células transgênicas cultivadas por longos períodos e possivelmente próximas a senescência. Entretanto, é necessário avaliar se o aumento na produção de embriões se reflete em melhoria na qualidade embrionária e da gestação de embriões clones transgênicos. Apoio FAPEMIG e CNPq.