

Inibição de histona deacetilase por tricostatina A em embriões bovinos produzidos por transferência nuclear com células somáticas

Savana Giacomini Brito, Carolina Capobianco Romano Quintão, Eliza Diniz de Souza, Natana Chaves Rabelo, Michele Munk Pereira, Lilian Tamy Iguma, Bruno Campos Carvalho, João Henrique Moreira Viana, Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Resumo

A TNCS é a técnica preferida para a geração de AGM, apesar de sua limitação, em parte atribuída ao pouco conhecimento dos processos celulares e moleculares envolvidos, dentre eles a reprogramação nuclear. A tricostatina A, um inibidor de histonas deacetilases, pode aumentar a qualidade do embrião bovino clonado e, consequentemente, as taxas de gestação. O efeito do tratamento de zigotos com tricostatina A foi avaliado na produção de embriões bovinos clones. Oócitos maturados *in vitro* foram desnudados e enucleados. Os zigotos foram reconstruídos com células somáticas bovinas e, posteriormente fusionados. Em seguida, esses zigotos foram ativados com ionomicina e divididos em 2 grupos: TRICO (n = 132), zigotos cultivados por 4h em 6-DMAP e 7h em CR2aa com 2,5% de SFB, suplementado com 50 nM de Tricostatina A e CONT (n = 116), zigotos cultivados nas mesmas condições acima, porém na ausência de Tricostatina A. O grupo PART (n = 287) foi utilizado como controle. Os embriões foram cultivados a 38,5 °C, em 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂. Embriões de 168 hpa dos grupos TRICO e CONT foram transferidos para receptoras. As análises foram feitas por ANOVA e as médias comparadas pelo teste SNK. Não houve diferença (P<0,05) entre os grupos na taxa de clivagem e de blastocistos. O grupo TRICO resultou em taxa de gestação, até os 60 dias, numericamente maior (64,2%) quando comparado ao CONT (45,4%). Uma gestação do grupo TRICO chegou a termo (7,1%), porém com morte no 2º dia após o nascimento. Nenhum nascimento foi obtido no grupo CONT. Conclui-se que o tratamento de zigotos clones com tricostatina A pode contribuir para melhorar o remodelamento da cromatina e favorecer as taxas de prenhez.

Palavras-chave: embriões; transferência nuclear; tricostatina A.

Inhibition of histone deacetylase by trichostatin A in bovine embryos produced by somatic cell nuclear transfer

Abstract

SCNT is the preferred technique for generating AGM, despite its limitations, partly attributed to poor knowledge of cellular and molecular processes involved, including the nuclear reprogramming. The trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, can increase the quality of cloned bovine embryos and, consequently, pregnancy rates. The effect of treatment of zygotes with trichostatin A was evaluated in the production of cloned cattle embryo. In vitro matured oocytes were denuded, and enucleated. The zygotes were reconstructed with bovine somatic cells and later fused. Then these zygotes were activated with ionomycin and divided into two groups: TRICO (n = 132), zygotes cultured for 4 h in 6-DMAP and 7h in CR2aa with 2.5% FCS, supplemented with 50 nM Trichostatin A and CONT (n = 116), zygotes cultured under the same conditions as above but in the absence of Trichostatin A. PART group (n = 287) was used as control. The embryos were cultured at 38.5 °C in 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂. Embryos a 168 hpa TRICO and CONT groups were transferred to recipients. Analyses were performed by ANOVA and means compared by SNK. There was no difference (P<0.05) between groups in cleavage and blastocyst. TRICO group resulted in pregnancy rates, up to 60 days, numerically higher (64.2%) compared to CONT (45.4%). A pregnancy group TRICO expired

(7.1%), but with death on the 2nd day after birth. No birth was obtained in the CONT group. We conclude that treatment of zygotes clones with trichostatin A can contribute to improving the remodeling of chromatin and further pregnancies rates.

Keywords: embryos; nuclear transfer; trichostatin A

Introdução

Com o avanço das pesquisas em biotecnologias reprodutivas e em genômica funcional, novas biotecnologias, como a transferência nuclear com células somática (TNCS) e a transgenia animal, podem contribuir para a atividade agropecuária. A TNCS abre perspectivas em novas áreas do conhecimento envolvendo a saúde animal e humana, além da produção de animais transgênicos (HEYMAN, 2005) com vantagens sobre outras técnicas de geração de animais geneticamente modificados (AGM) como, por exemplo, a microinjeção pronuclear (KEEFER, 2004). Pode ter aplicação na multiplicação de animais e na preservação de espécies em risco de extinção como também na produção animal e ser aplicada, não somente para gerar biofármacos, mas também para melhorar a composição do alimento ou a saúde dos AGMs, proporcionando um retorno maior para a atividade agropecuária.

Em um esforço de melhorar a eficiência da TNCS, estudos recentes utilizaram um agente químico inibidor da histona deacetilase chamado tricostatina em embriões recém-construídos (IWAMOTO et al., 2008). A acetilação de histonas do DNA está associada ao relaxamento da estrutura da cromatina, tornando-a mais permissiva a transcrição e replicação, enquanto a deacetilação de histonas tem efeito oposto. Assim, a tricostatina A aumenta a acetilação da histona e o remodelamento da cromatina de embriões obtidos através da técnica de transferência nuclear, o que pode contribuir para aumentar a qualidade dos embriões bovinos clonados e as taxas de gestação. (CAMARGO et al., 2005; ONO; KONO, 2006; MIGLINO et al., 2007).

Espera-se que com essa estratégia seja possível a produção de embriões e recém-nascidos geneticamente modificados de melhor qualidade.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, no laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite. Oócitos obtidos de ovários de abatedouros foram maturados *in vitro*, desnudados e expostos ao Hoechst 33342 (Sigma, St Louis, EUA) e citocalasina (Sigma) antes da enucleação. Zigotos foram reconstruídos com células somáticas de fêmea adulta da raça Gir, fusionados com dois pulsos de 2,4 kV/cm de 30 μ seg e ativados com ionomicina (Sigma) por 5 minutos. Em seguida, os zigotos foram aleatoriamente divididos em dois grupos: Tricostatina (TRICO; n=132) – zigotos cultivados por 4h em 6-DMAP seguido de 7h em meio CR2aa com 2,5% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, Brasil), ambos suplementados com 50 nM de Tricostina A (Sigma); Controle (CONT; n=116) – zigotos cultivados nas mesmas condições acima porém na ausência de Tricostatina A. Embriões partenogenéticos (PART; n=287) foram utilizados como controle.

Os embriões de todos os grupos foram cultivados em CR2aa com 2,5% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, Brasil) a 38,5 °C, em atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂. Embriões com 168h pós-ativação (hpa) de ambos os grupos foram transferidos para receptoras. Analisou-se a taxa de clivagem com 72h e blastocistos com 168 hpa. As médias foram comparadas pelo teste de *Student Newman Keuls* (SNK). Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão médio (EPM). As taxas de prenhes e de nascimento foram analisadas pelo Teste Exato de Fischer.

Resultados e Discussão

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos TRICO, CONT e PART na taxa de clivagem e de blastocistos.

Embora não houvesse diferença significativa, o grupo TRICO resultou em taxa de gestação, até os 60 dias,

numericamente maior (64,2%; 9/14) quando comparado com o grupo CONT (45,4%; 5/11). Uma gestação do grupo TRICO chegou a termo (7,1%; 1/14), porém com morte no segundo dia após o nascimento. Nenhum nascimento foi obtido com embriões do grupo CONT.

Tabela 1. Taxas de clivagem e blastocisto referentes aos grupos tricostatina, partenogenético e controle.

Grupos	N	Taxa de Clivagem $\pm$ EPM (%)	Taxa de Blastocisto $\pm$ EPM (%)
(1) Trico	132	87,7 $\pm$ 4,1	38,4 $\pm$ 4,7
(2) Part	287	79,3 $\pm$ 4,1	30,5 $\pm$ 3,7
(3) Cont	116	83,3 $\pm$ 4,0	34,2 $\pm$ 6,0

Trico = Tricostatina; Part = Partenogenético; Cont = Controle; N = número de estruturas.

Conclusões

Estes resultados sugerem que o tratamento de zigotos clones com 50 nM de tricostatina pode favorecer a taxa de prenhez, por possibilitar uma melhor reprogramação nuclear através de remodelamento mais adequado da cromatina dos embriões clonados.

Agradecimentos

A Embrapa Gado de Leite ao CNPq e à Fapemig pelo apoio ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

CAMARGO L. S. A.; POWELL A. M.; VALE FILHO V. R.; WALL, R. J. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by in vitro fertilization or somatic cell nuclear transfer. **Reproduction and Fertility Development**, v.17, p. 487-496, 2005.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p.353-361, 2005.

IWAMOTO, D.; KISHIGAMI, S.; TANIGUCHI, S.; ABE, Y.; MATSUI, T., KASAMATSU, A.; TATEMIZO, A. et al. Effects of trichostatin A on DNA methylation in cloned bovine embryos. **Reproduction and Fertility Development**, v. 20, p. 99, 2008. Abstract.

Keefer, CL. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 5-12, 2004.

MIGLINO, M. A.; PEREIRA, F. T.; VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. M.; MEIRELLES, F. V.; RUMPF, R.; AMBRÓSIO, C. E.; PAPA, P. C.; SANTOS, T. C.; CARVALHO, A. F.; LEISER, R.; CARTER, A. M. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, p. 604-617, 2007.

ONO, Y, KONO, T. Irreversible barrier to the reprogramming of donor cells in cloning with mouse embryos and embryonic stem cells. **Biology and Reproduction**, v. 75, p. 210-216, 2006.