

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RAYLENE RAMOS MOURA

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PRÓ-NUCLEARES EM FÊMEAS DOADORAS
DAS RAÇAS CANINDÉ E SAANEN DURANTE UM PROGRAMA DE
TRANSGÊNESE CAPRINA

FORTALEZA-CE
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RAYLENE RAMOS MOURA

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PRÓ-NUCLEARES EM FÊMEAS DOADORAS
DAS RAÇAS CANINDÉ E SAANEN DURANTE UM PROGRAMA DE
TRANSGÊNESE CAPRINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas.

FORTALEZA-CE

2008

RAYLENE RAMOS MOURA

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PRÓ-NUCLEARES EM FÊMEAS DOADORAS
DAS RAÇAS CANINDÉ E SAANEN DURANTE UM PROGRAMA DE
TRANSGÊNESE CAPRINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 17/12/2008.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
Orientador – UECE

Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior
Examinador - UNIFASF

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo
Examinador - UECE

Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira
Examinador - UECE

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”

John Ruskin.

*À minha família pelo apoio, encorajamento,
amor e pelos ensinamentos que formaram os
alicerces de minha história.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência, pelo amparo nos momentos difíceis, por mostrar os caminhos nas horas incertas me dando força interior para superar as dificuldades e alcançar meus objetivos.

Ao meu pai, Raimundo Moura Alves, por sempre ter sido meu maior incentivador para enfrentar limitações e desafios, além de representar um símbolo de determinação e conquistas. Agradeço também por todo apoio que tem me dado apesar da distância e por eu estar sempre em suas orações.

À minha mãezinha, Marislene Ramos Moura, por sua doçura e carisma e por sempre encontrar abrigo em seus braços, me compreender até pelo olhar e pelas palavras amigas capazes de me restabelecer.

As minhas irmãs Michelle e Milena Ramos Moura que apesar da ausência ou distância que nos têm privado de uma maior convivência agradeço pelo carinho, amizade e preocupação.

Ao meu noivo, Augusto César Oliveira de Araújo, por ser o amigo de todas as horas sempre tendo palavras de incentivos e conselhos e por ser o companheiro disposto a dar carinho e alento nos momentos de dificuldades e alegrias.

Aos meus segundos pais, quase sogros, Francisco Fernandes Silva de Araújo e Maria Carmina Oliveira de Araújo, pelas inúmeras vezes que foram pontos de apoio e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas, por ter me proporcionado trilhar novos desafios desde a iniciação científica, me fazer acreditar em um trabalho honesto e agradeço também por toda a dedicação e esforços que contribuíram para a minha formação técnico - científica e pessoal.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior, pelos conselhos, disponibilidade, interesse e dedicação em ter colaborado neste trabalho. Além disso, agradeço pela amizade, por ser exemplo de dedicação à docência e pelas sugestões oferecidas.

Ao Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira pela colaboração, convívio e amizade.

À Profa. Dra. Luciana Magalhães Melo pelo exemplo de pesquisadora, pelas sugestões oferecidas durante o exame de qualificação e por estar sempre disposta em colaborar com um conselho ou opinião.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueirêdo pelas sugestões e colaboração visando a melhoria deste trabalho.

À Dra. Irina Serova e Lyudmila Andreeva pela participação nas manipulações dos embriões e por toda a colaboração neste experimento.

Aos amigos Daniel Holanda Soares e Francisco José Benevides, pela amizade e dedicação em colaborar nas diversas etapas de execução deste trabalho. Obrigada por todo o esforço dispensado para que tudo ocorresse de forma tranqüila e desejável.

À amiga Juliana Vieira Luz, a sua amizade foi muitas vezes um porto seguro nos momentos que precisei de uma palavra de incentivo, apoio e conselhos. Muito obrigada também por nunca me faltar e por ser essa pessoa maravilhosa e marcante.

Aos amigos João Batista Cajazeiras e Suely Renata Gaya Avelar por estarem sempre dispostos a me oferecer um ombro amigo, além dos seus conselhos e incentivos pertinentes.

Aos amigos Francisco Carlos de Sousa, Lécio Leone de Almeida, Karlliely de Castro Almeida e Alexsandra Fernandes Pereira pela amizade, companheirismo, convivência e apoio.

Aos demais amigos do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Agostinho Soares de Alcântara Neto, Suyanne Alves da Cruz, Érica Souza Albuquerque, Sabrina Tainah da Cruz Silva, Camilla Rebouças Guimarães e Carlos Henrique Sousa de Melo pela colaboração, incentivo e amizade. Ao Selmar Alves da Silva, grande amigo, pelo respeito e prestatividade na realização de atividades do laboratório. Ao amigo Antônio César Camelo pela colaboração e pelos dias de agradáveis momentos de descontração.

A todos os professores, funcionários e colegas de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Meus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Estadual do Ceará pela disponibilização do espaço físico para a realização do projeto.

Agradeço a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional e àqueles que não mediram esforços para que tudo ocorresse de forma desejável no decorrer deste experimento.

RESUMO

A produção eficiente e a qualidade dos embriões pró-nucleares são fundamentais para o sucesso de um programa de transgênese caprina. Assim, este trabalho teve por objetivo comparar a produção quanti-qualitativa de embriões pró-nucleares em duas raças caprinas para posterior microinjeção de DNA. Para tanto, foram utilizadas fêmeas das raças Saanen (n = 12) e Canindé (n = 12), as quais tiveram o estro sincronizado pelo uso de esponjas vaginais por 10 dias e d-cloprostenol no oitavo dia. Neste momento, as cabras receberam 120 mg (Canindé) ou 200 mg (Saanen) de NIH-FSH-P1, intervaladas de 12 h por três dias. As fêmeas também receberam 100 µg de GnRH às 36 h após a retirada da esponja e foram cobertas às 36 e 48 h após o final do tratamento progestágeno. A colheita embrionária foi realizada por lavagem do oviduto. Os embriões pró-nucleares foram microinjetados com uma construção de DNA contendo o gene hG-CSF e a qualidade da microinjeção foi avaliada subjetivamente. Além disso, foram mensurados em cada embrião o diâmetro total, espessura da zona pelúcida, diâmetro do citoplasma e diâmetro dos pró-núcleos. A taxa de ovulação foi maior ($P < 0,05$) na raça Saanen ($24,5 \pm 11,7$) que na raça Canindé ($11,8 \pm 7,0$). Foi verificada uma menor porcentagem ($P < 0,05$) de estruturas fecundadas na raça Saanen (36,2%) em relação à raça Canindé (89,9%). A raça Canindé também produziu um maior percentual ($P < 0,05$) de embriões pró-nucleares: 72,5% vs. 20,6%. A microinjeção de DNA foi considerada boa em 96,7% e 73,3% nos embriões Canindé e Saanen, respectivamente ($P < 0,05$). Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas para todos os parâmetros embrionários mensurados, com exceção do diâmetro do citoplasma. Desta forma, doadoras da raça Canindé foram mais eficientes que aquelas da raça Saanen no que se refere à produção de embriões pró-nucleares.

Palavras-chave: Caprino. Embrião pró-nuclear. Microinjeção de DNA. Transgênese. Raça naturalizada.

ABSTRACT

The efficient production and quality of the pronuclear embryos are fundamental for the success of transgenesis programme. Thus, this work aimed to compare in two goats breed for embryo yield to be used for DNA microinjection. For this, Canindé (n = 12) and Saanen (n = 12) goat were heat-synchronized using vaginal sponges for 10 days and cloprostenol on the eighth day. In this moment, donors received 120 mg (Canindé) or 200 mg (Saanen) of NIH-FSH-P1 given twice daily in decreasing doses over three days. All goats received an injection of GnRH at 36 h after sponge removal and they were hand-mated at 36 and 48 h after sponge removal. Embryo recovery was performed by oviduct flushing. Embryos were microinjected with a DNA construct containing the hG-CSF gene and the quality of microinjection was subjectively evaluated. The following parameters were measured for each embryo: total diameter, cytoplasm diameter, zona pellucida thickness and pronuclei diameter. The ovulation rate was higher ($P < 0.05$) in Saanen (24.5 ± 11.7) than Canindé (11.8 ± 7.0) breed. It was observed a lower ($P < 0.05$) percentage of fertilized ova in Saanen (36.2%) than Canindé (89.9%). Also Canindé donors produced a higher percentage ($P < 0.05$) of pronuclear embryos when compared to Saanen: 72.5% vs 20.6%, respectively. The microinjection was evaluated as good in 96.7% and 73.3% of times in Canindé and Saanen embryos, respectively ($P < 0.05$). Significant differences ($P < 0.05$) were observed for all morphometric parameters except for cytoplasm diameter. In conclusion, Canindé donors were more efficient than Saanen in yield of pronuclear-stage embryos.

Keywords: Goat. Pronuclear embryo. DNA microinjection. Transgenesis. Local breed.

LISTA DE FIGURAS

1. Revisão de Literatura

- **Figura 1** – Méritos relativos de diferentes sistemas de expressão de proteínas. Velocidade: tempo de expressão gênica; Custo/g: custo total da proteína; Larga escala: produção lenta ou rápida. Fonte: Dyck *et al.* (2003)..... 17
- **Figura 2** – Esquema de obtenção de animais transgênicos pelo uso de TNCS. (A) Transfecção de células; (B) Clonagem de fundador transgênico..... 22
- **Figura 3** – Fluxograma de produção de caprinos transgênicos por microinjeção pró-nuclear de DNA..... 24
- **Figura 4** – Etapas da microinjeção pró-nuclear de embriões: (1) Aproximação da pipeta de microinjeção contendo a construção de interesse enquanto o embrião se encontra apreendido pela pipeta “holding”; (2) Microinjeção da construção no pró-núcleo; (3) Após a microinjeção, a pipeta é retirada ao mesmo tempo que o aumento do pró-núcleo recém-microinjetado é verificado. Fonte: Freitas (2005)..... 25
- **Figura 5** – Porcentagem de embriões pró-nucleares após tratamento com GnRH às 24 e 36 h após o término do tratamento progestágeno. Fonte: Baldassarre *et al.* (2004)..... 27

2. Capítulo 1

- **Fig. 1** – Correlation between the number of CHs and unfertilized ova in Canindé (A) and Saanen (B) goats..... 41
- **Fig. 2** – DNA microinjection in pronuclear embryos recovered from Canindé (A) and Saanen (B) goats (X 300)..... 42
- **Fig. 3** – Microinjection quality (good, regular or poor) in pronuclear embryos recovered from Canindé and Saanen goats (a,b: $P < 0.05$)..... 42

3. Anexos

- **Figura 1** – Oócitos e embriões caprinos das raças Canindé e Saanen utilizados em um programa de transgênese..... 68

LISTA DE TABELAS

1. *Revisão de Literatura*

- **Tabela 1** – Proteínas recombinantes produzidas por caprinos transgênicos..... 19
- **Tabela 2** – Proteínas recombinantes produzidas por caprinos biorreatores com propósitos comerciais. Fonte: Baldassarre (2008)..... 20
- **Tabela 3** – Efeito da idade da cabra no momento da COL sobre os parâmetros mais importantes na eficiência da COL/FIV. Fonte: Baldassarre *et al.* (2003a)..... 29
- **Tabela 4** – Produção *in vitro* de embriões utilizando sêmen de bodes transgênicos de 5 meses de idade. Fonte: Baldassarre *et al.* (2002)..... 29
- **Tabela 5** – Taxa de transgênese a partir de microinjeção pró-nuclear de embriões obtidos de produção *in vivo* e *in vitro*. Fonte: Baldassarre (2005)..... 30
- **Tabela 6** – Taxas de integração e receptoras requeridas. Fonte: Huang *et al.* (2001)..... 31

2. *Capítulo 1*

- **Table 1** – Effect of breed on the stage of development of embryos recovered..... 41
- **Table 2** – Effect of breed on the morphometric characteristics of pronuclear embryos..... 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
CEUA	Comitê de ética de uso animal
CIDR	Control Internal Drug Release (Dispositivo Interno de Liberação Controlada)
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COL	Colheita oocitária por laparoscopia
CTNbio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DIC	Differential Interference Contrast
DNA	Desoxyribose Nucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
eCG	Equine Chorionic Gonadotrophin (Gonadotrofina Coriônica Equina)
FGA	Fluorogestone acetate (acetato de fluorogestona)
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
h	Hora
hCG	Human Chorionic Gonadotropin (Gonadotrofina Coriônica humana)
hG-CSF	Human Granulocyte Colony Stimulating Factor (Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano)
h-tPA	Human Tissue Plasminogen Activator (Ativador de plasminogênio tissular humano)
Kb	Quilobases
LFCR	Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução
MAP	Medroxiprogesterone acetate (acetato de medroxiprogesterona)
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mg	Miligramas
MPF	M-phase Promoting Factor (Fator Promotor da Metáfase)
PIV	Produção <i>in vitro</i>
TCM	Tissue Culture Medium (Meio de Cultivo de Tecido)
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
UECE	Universidade Estadual do Ceará
µL	Microlitro

SUMÁRIO

Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	11
Lista de Abreviaturas e Siglas	12
1 Introdução	14
2 Revisão de Literatura	16
2.1 Transgênese animal	16
2.2 Métodos de obtenção de caprinos transgênicos	21
2.2.1 Transferência nuclear de células somáticas	21
2.2.2 Microinjeção pró-nuclear	24
2.2.2.1 Produção <i>in vivo</i> de embriões	25
2.2.2.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões	28
2.2.2.3 Produção <i>in vivo x in vitro</i> de embriões	30
3 Justificativa	32
4 Hipótese Científica	33
5 Objetivos	34
5.1 Geral	34
5.2 Específicos	34
6 Capítulo 1 Pronuclear embryo yield in Canindé and Saanen goats to DNA microinjection	35
7 Conclusões gerais	51
8 Perspectivas	52
9 Referências Bibliográficas	53
10 Anexos	61

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia transgênica tem se destacado dentre os avanços da biotecnologia devido à possibilidade de manipulação genética *in vitro* de organismos (Pesqueiro *et al.*, 2002). Desta maneira, a transgênese vem proporcionando um maior entendimento sobre os processos biológicos apresentando inúmeras aplicações na biomedicina, biologia molecular e na agropecuária através da adição ou inativação de genes de interesse (Montoliu & Lavado, 2005).

Dentre as possibilidades de aplicação desta biotécnica, destaca-se a capacidade de entendimento do controle genético dos sistemas fisiológicos e doenças que acometem os seres vivos, além de incrementar a produção zootécnica e gerar novos produtos de origem animal com interesse em saúde humana (Wheeler *et al.*, 2008). Dessas aplicações, a mais concreta e freqüente é a utilização de biorreatores para produção de proteínas de interesse farmacêutico (Baldassarre, 2008). Além disso, as pesquisas referentes à produção de animais transgênicos estão se tornando cada vez mais relevantes devido à produção de proteínas recombinantes a partir de mamíferos (Niemann & Kues, 2003). Assim, trata-se de uma alternativa diante de outros sistemas convencionais devido à possibilidade de produção em larga escala, além de obtenção de padrões de glicosilação e modificações pós-traducionais corretos (Kues & Niemann, 2004).

Dentre as diversas espécies utilizadas como biorreatores, a caprina apresenta-se como um modelo bastante interessante, já que são animais capazes de produzir centenas de quilogramas de proteínas recombinantes por ano (Baldassarre & Karatzas, 2004). Além disso, apresentam menor custo de manutenção, maturidade sexual mais precoce e um período relativamente curto de gestação quando comparada à espécie bovina (Freitas, 2005).

No Brasil, caprinos naturalizados são detentores de características peculiares como rusticidade, adaptabilidade, maior resistência às doenças e parasitas as quais foram conquistadas com a adaptação às condições sanitárias, de clima e manejo encontrados nos mais diferentes habitats (Egito *et al.*, 2001). Assim, estes caprinos desempenham não somente um importante papel no contexto econômico da região Nordeste, mas também representam um relevante recurso biológico de considerável variabilidade genética e valor histórico que precisam ser preservados em favor da biodiversidade (Mariante & Egito, 2002).

Apesar dos caprinos naturalizados não serem grandes produtores de leite, os mesmos podem ser utilizados como biorreatores, já que a expressão do transgene é um fator variável quando são obtidos transgênicos por microinjeção (Baldassarre & Karatzas, 2004). Dentre as

raças/tipos raciais brasileiros, destaca-se a raça Canindé por apresentar melhor habilidade leiteira em comparação com as demais (Mariante & de Bem, 1992). Além disso, uma das maneiras de melhorar o interesse pela raça seria utilizá-la em programas de transgênese, agregando valor a mesma podendo, desta maneira, despertar interesse em sua produção e conservação.

Na produção de caprinos transgênicos tem sido frequentemente utilizado o método de microinjeção pró-nuclear de embriões produzidos *in vivo* (Baldassarre *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2008). Para tanto, as fêmeas doadoras são submetidas a diversas etapas como sincronização de estro, superovulação, cobertura ou inseminação artificial seguida da detecção de estro e lavagem ovidutária para recuperação dos embriões (Baldassarre & Karatzas, 2004). Após a execução de todas estas etapas, ainda restam a microinjeção da construção de interesse nos embriões pró-nucleares e a transferência dos mesmos para receptoras previamente preparadas. Desta forma, a produção de embrião pró-nuclear (PN), do ponto de vista quantitativo e qualitativo, torna-se essencial para o sucesso do programa de transgênese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transgênese animal

Desde o nascimento do primeiro mamífero transgênico (Gordon *et al.*, 1980), vários progressos foram obtidos nas técnicas e resultados de transgênese animal. O aperfeiçoamento da transgênese para produção de animais biorreatores representa uma ferramenta promissora para a biomedicina através da produção de proteínas recombinantes de alto valor biológico. Embora muitas proteínas terapêuticas humanas estejam sendo produzidas por sistemas microbiológicos (Figura 1), utilizando a tecnologia de DNA recombinante, este tipo de processamento não se mostra adequado para um grande número de proteínas bioativas (Clark, 1998). Isso decorre da incapacidade das bactérias realizarem reações de modificações pós-traducionais que são requeridas para a estabilidade e atividade biológica plena da proteína (Goldman *et al.*, 2002b). Diante disso, o uso de células animais é pertinente para que ocorram modificações pós-traducionais adequadas (Montesino & Toledo, 2006). Na atividade biológica das proteínas, a glicosilação é um tipo de modificação importante, além de se mostrar essencial para a estabilidade de muitas dessas moléculas na circulação sanguínea (Clark, 1998; Zhou *et al.*, 2005). Este fato ocorre mais frequentemente quando utiliza-se a glândula mamária de algumas espécies animais para produção de proteínas recombinantes (Zhou *et al.*, 2005). Neste sentido, a transgênese animal tem sido considerada de significativa contribuição para a saúde humana e para a medicina terapêutica (Kues & Niemann, 2004).

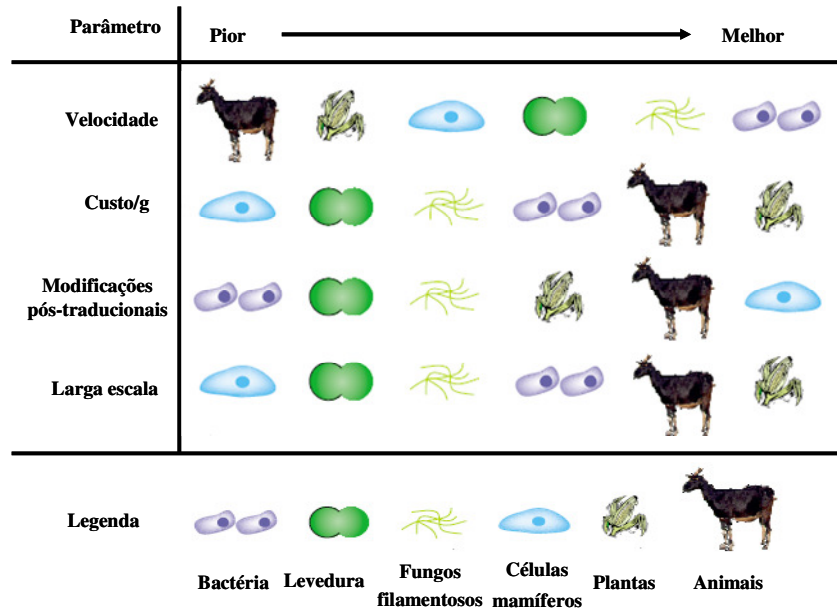


Figura 1 – Méritos relativos de diferentes sistemas de expressão de proteínas. Velocidade: tempo de expressão gênica; Custo/g: custo total da proteína; Larga escala: produção lenta ou rápida. Fonte: Dyck *et al.* (2003).

Os animais transgênicos biorreatores são produzidos para expressarem proteínas recombinantes em células, tecidos ou fluidos fisiológicos. No entanto, a maioria dos estudos têm sido voltados para a expressão de proteínas nos fluidos corporais (leite, sangue, urina ou sêmen), utilizando promotores tecido-específicos, por serem constantemente produzidos e as proteínas isoladas mais facilmente (Collares & Seixas, 2005). Segundo Dyck *et al.* (2003), para cada um desses sistemas de produção a partir de fluidos corpóreos existem vantagens e desvantagens:

- **Leite:** a glândula mamária tem sido geralmente, o tecido de escolha para expressar proteínas recombinantes em espécies leiteiras tradicionais, já que o leite é facilmente obtido. Contudo, a produção de proteínas no leite é limitada pelo intervalo relativamente longo entre o nascimento até a primeira lactação do animal em vista dos investimentos requeridos. Além disso, certas proteínas bioativas produzidas no leite podem provocar efeitos adversos no animal. Isto pode ocorrer quando são produzidas altas concentrações destas proteínas e as mesmas podem ser reabsorvidas.
- **Sangue:** não é um fluido ideal, já que para ser obtido utiliza-se um método bastante invasivo quando se deseja isolar proteínas recombinantes. Quando as mesmas estão bioativas, podem afetar a saúde do animal e a produção em escala comercial é inviável.

- Urina: embora o epitélio da bexiga possa secretar proteínas, as taxas são mínimas, o que torna este sistema pouco rentável para produzir proteínas recombinantes.
- Sêmen: por apresentar uma grande capacidade de produção contínua de proteínas durante a vida reprodutiva, tem atraído interesse principalmente na espécie suína, embora haja poucos estudos sobre seqüências regulatórias e promotores que promovem a expressão de proteínas nas glândulas sexuais.

Para a produção de proteínas recombinantes, alguns aspectos devem ser levados em consideração para a escolha da espécie biorreatora como a demanda do mercado, volume de leite produzido por lactação e tempo de geração de seus descendentes (Clark, 1998). De todos os mamíferos transgênicos biorreatores já produzidos, a espécie caprina tem representado um excelente modelo de transgênese, já que a produção de animais fundadores e custos operacionais são significativamente inferiores em relação aos bovinos e, além disso, um pequeno número de exemplares desta espécie pode suprir a demanda para a maioria das proteínas recombinantes requeridas no mercado (Baldassarre, 2008). Wall *et al.* (1992) estimaram que o custo para produzir uma vaca transgênica por microinjeção pró-nuclear pode chegar a US\$ 546.000, enquanto para produzir uma cabra seria necessário investir US\$ 60.000.

Desde a produção dos primeiros caprinos que carregavam genes heterólogos em seu material genético (Ebert *et al.*, 1991), várias pesquisas já foram realizadas com o mesmo objetivo, ou seja, a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico (Tabela 1). Além disso, a exequibilidade da técnica para produção em larga escala posteriormente foi confirmada (Edmunds *et al.*, 1998; Baldassarre *et al.*, 2003a).

A aplicação da transgênese para produção de proteínas recombinantes tem sido vista como uma oportunidade econômica (Tabela 2) que tem estimulado o desenvolvimento de uma nova indústria, bem como de metodologias para a melhoria da eficiência na produção de animais transgênicos (Baldassarre *et al.*, 2002). Em vista disso, diversas empresas privadas, universidades ou centros de pesquisa de países como o Canadá, Estados Unidos, Inglaterra, França, Israel, Coreia do Sul, China e Brasil têm produzido caprinos biorreatores. Sob ponto de vista de aplicação comercial imediata, destacam-se as empresas GTC Biotherapeutics (EUA) e Nexia Biotechnologies (Canadá). No Brasil, destaca-se o trabalho pioneiro do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), o qual obteve os

Tabela 1 – Proteínas recombinantes produzidas por caprinos transgênicos.

Proteína recombinante	Indicação	Referência
Ativador de plasminogênio tissular humano (h-tAP)	Infarto agudo do miocárdio e trombose	Ebert <i>et al.</i> , 1991; Baldassarre <i>et al.</i> , 2004.
Anti-trombina III	Resistência à heparina	Edmunds <i>et al.</i> , 1998; Baguisi <i>et al.</i> , 1999; Reggio <i>et al.</i> , 2001; Zhou <i>et al.</i> , 2005.
Anticorpos monoclonais	Várias incluindo câncer e AIDS	Young <i>et al.</i> , 1998; Pollock <i>et al.</i> , 1999; Melican <i>et al.</i> , 2005; Melican & Gavin., 2008.
Antígenos contra malária	Vacinação	Behboodi <i>et al.</i> , 2005.
α -fetoproteína humana	Doenças autoimunes	Parker <i>et al.</i> , 2004.
Butiril-colinesterase humana	Intoxicação por organofosforados	Cerasoli <i>et al.</i> , 2005.
Fator IX da cascata da coagulação	Coagulação	Huang <i>et al.</i> , 2001.
Fator estimulante de colônias granulócitos	Neutropenia (câncer e AIDS)	Ko <i>et al.</i> , 2000; Lee <i>et al.</i> , 2000; Freitas <i>et al.</i> , 2007; Shin <i>et al.</i> , 2008.
Lactoferrina humana	Antimicrobiano, antitumoral, antiinflamatório	Zhang <i>et al.</i> , 2008.
Proteína de teia de aranha	Fios de sutura; próteses	Karatzas <i>et al.</i> , 1999; Baldassarre <i>et al.</i> , 2003a.
Proteína de superfície de antígeno do vírus da hepatite B	Vacina contra Hepatite B	Zhang <i>et al.</i> , 1997.
Lisozima	Antimicrobiano	Maga <i>et al.</i> , 2006.

primeiros caprinos nascidos por microinjeção pró-nuclear (Freitas *et al.*, 2003), bem como o nascimento do primeiro caprino transgênico da América Latina (Freitas *et al.*, 2007). Este animal possuía em seu genoma o gene que codifica a proteína do Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF).

Tabela 2 – Proteínas recombinantes produzidas por caprinos biorreatores com propósitos comerciais.

Proteína recombinante	Empresa	Estágio de desenvolvimento
Anti-trombina III	GTC Biotherapeutics	Completo
Ativador de plasminogênio tissular	Nexia Biotechnologies	Pré-clínico
Anticorpos monoclonais	GTC Biotherapeutics	Pré-clínico
Antígenos contra malária	GTC Biotherapeutics	Pré-clínico
α -fetoproteína humana	GTC Biotherapeutics	Fase I
Butiril-colinesterase humana	Nexia Biotechnologies	Pré-clínico
Proteína de teia de aranha	Nexia Biotechnologies	Pré-clínico

Fonte: Baldassarre (2008).

Da produção dos animais biorreatores até a comercialização da proteína humana de interesse para uso clínico, várias etapas são necessárias que vão desde avaliações referentes ao próprio animal transgênico, à proteína em questão até testes pré-clínicos e clínicos antes da proteína ser aprovada para uso humano (Clark, 1998). Atualmente, somente uma proteína recombinante produzida por caprinos foi liberada para uso clínico, a α -anti-trombina humana (Atryn[®]). Esta autorização foi concedida em 2006 para comercialização no mercado da União Européia do medicamento ATryn[®]. Assim, validou-se a tecnologia de transgenia em caprinos para produção de proteínas recombinantes (Schmidt, 2006).

2.2 Métodos de obtenção de caprinos transgênicos

Basicamente, caprinos transgênicos já foram obtidos através do uso das duas principais técnicas: a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) e a microinjeção de uma determinada construção em um dos pró-núcleos de zigotos. Estas duas técnicas serão descritas detalhadamente nos itens a seguir.

2.2.1 Transferência nuclear de células somáticas

A TNCS ou clonagem combinada com metodologias da biologia molecular e cultivo celular apresenta uma variedade de aplicações (Vajta & Gjerris, 2006). A comprovação de que os núcleos de células derivadas de diferentes tecidos somáticos permanecem capazes de gerar um novo indivíduo, despertou um grande interesse em diversas áreas da pesquisa e para fins comerciais (Baldassarre, 2008).

Entre as diferentes áreas, a transgênese é possivelmente a que mais se beneficiou com os avanços desta biotécnica no sentido de aumentar a eficiência quando comparada a outros métodos e, conseqüentemente, reduzir os custos para gerar animais transgênicos. Desta forma, a TNCS abriu novas perspectivas tanto na produção quanto na propagação de animais transgênicos (Baldassarre & Karatzas, 2004). Assim, a partir desta técnica existem várias aplicações na transgenia animal (Bordignon & Henkes, 2005), como:

- Transfecção de células em cultivo utilizando a pressão seletiva onde as células transformadas podem ser avaliadas quanto à região de integração, número de cópias inseridas, integridade e expressão do transgene antes de utilizar estas células para produzir animais clonados;
- Possibilidade de realização de modificações genéticas direcionadas onde os genes endógenos podem ser modificados ou os genes exógenos inseridos numa posição cromossômica pré-determinada;
- Propagação de animais fundadores com uma eficiência de 100% de obtenção de transgênicos pela produção de animais geneticamente idênticos.

De uma maneira geral, a TNCS pode contribuir para obtenção de animais transgênicos após a transfecção de células doadoras de núcleo ou na clonagem de fundadores transgênicos (Figura 2).

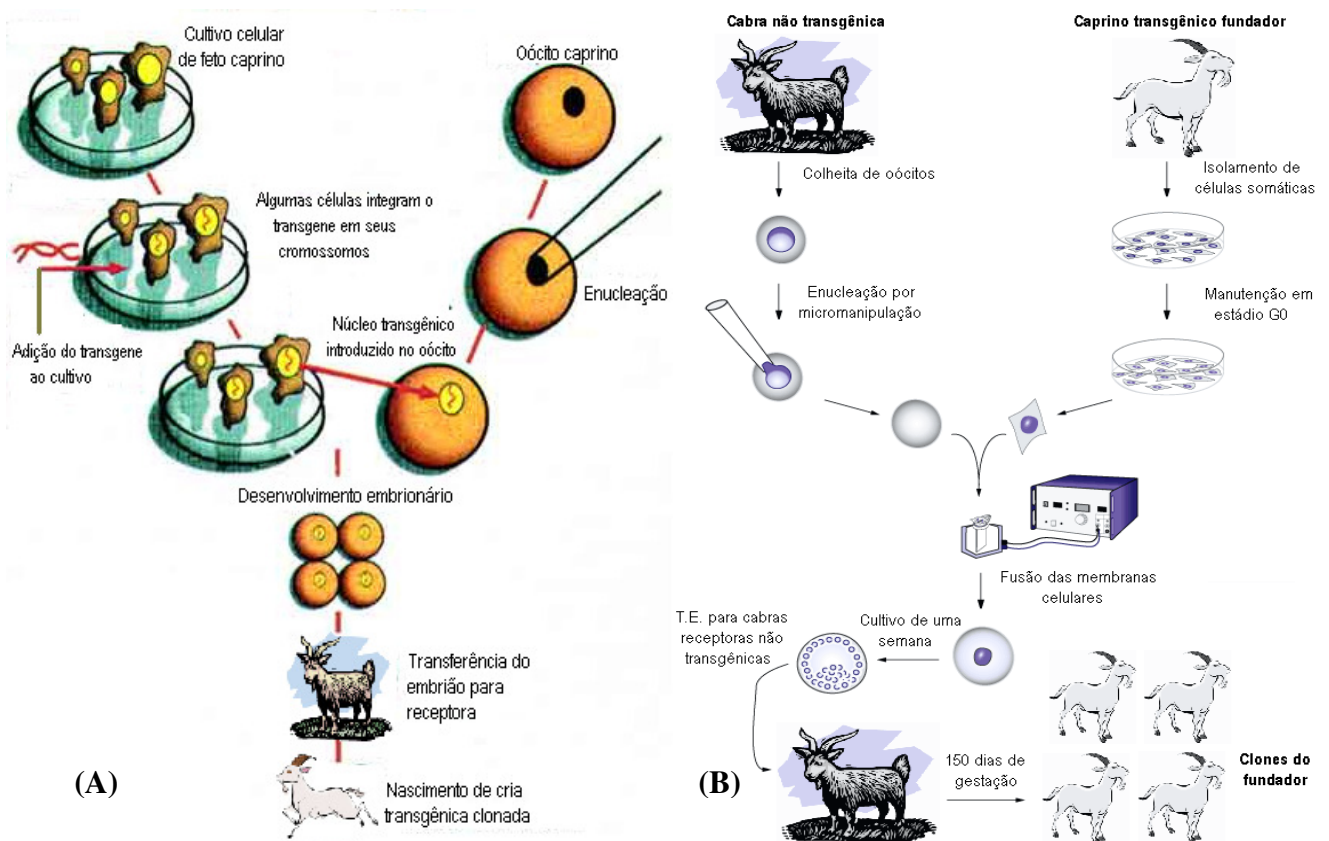


Figura 2 – Esquema de obtenção de animais transgênicos pelo uso de TNCS. (A) Transfecção de células; (B) Clonagem de fundador transgênico.

Desde o nascimento da ovelha Dolly, a tecnologia básica para produzir clones por TNCS continua a mesma (Baldassarre, 2008). Assim, de maneira geral consiste em transferir núcleos de células doadoras (carioplastos) para oócitos em metáfase II enucleados (citoplastos) com posterior reconstrução do embrião através de fusão celular e transferência para uma receptora previamente sincronizada.

A) Preparação dos oócitos receptores (citoplastos): utilizam-se oócitos produzidos *in vivo*, seja por lavagem ovidutária (Baguisi *et al.*, 1999; Melican *et al.*, 2005); colheita oocitária por laparoscopia (COL) seguida de maturação *in vitro* (MIV) (Baldassarre *et al.*, 2003b) ou mesmo oócitos oriundos de ovários de abatedouro (Reggio *et al.*, 2001). Nesta fase, a qualidade oocitária é fundamental para reverter a diferenciação dos núcleos transferidos e para suportar o período inicial do desenvolvimento embrionário. Além disso, o estágio celular que o oócito se encontra é um dos momentos decisivos para o sucesso da técnica de TNCS. A três principais etapas da transferência nuclear relacionadas aos citoplastos são a maturação, enucleação e a ativação.

- Maturação: refere-se mais especificamente a fase da maturação meiótica que consiste em obter oócitos em metáfase II. Esta maturação tem sido realizada tanto *in vivo* (Melican *et al.*, 2005) quanto *in vitro* através da MIV (Baldassarre *et al.*, 2003b). Segundo Bordignon & Henkes (2005), existem estudos que demonstraram melhores resultados utilizando oócitos maturados *in vivo*. No entanto, Reggio *et al.* (2001) não verificaram tal diferença.
- Enucleação: os oócitos são desnudos, avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar e da placa metafásica e expostos a substâncias desestabilizadoras. Em caprinos, geralmente se utiliza citocalasina B para desestabilizar reversivelmente os filamentos de actina para fornecer uma elasticidade no momento da retirada do corpúsculo polar e da placa metafásica através de uma micropipeta. Além disso, confirma-se a retirada deste material através da utilização de Hoechst e epifluorescência.
- Ativação: ocorre indução da degradação de complexos enzimáticos responsáveis em manter os oócitos em metáfase II como o MPF (Fator Promotor da Metáfase). Para tanto, esta fase é dependente de várias ondas de liberação de cálcio no interior do oócitos para mimetizar o que ocorre no momento da fecundação. Desta forma, podem-se utilizar agentes químicos, físicos ou elétricos. Em caprinos, têm se utilizado, principalmente, ionóforos e etanol (Baguisi *et al.*, 1999; Baldassarre, 2003b). Além disso, cicloheximida (Melican *et al.*, 2005) ou inibidores de enzimas quinases (Behboodi *et al.*, 2004) têm sido utilizados por algumas horas para evitar que a atividade do MPF seja restabelecida.

B) Preparação de células doadoras de núcleo (carioplastos): esta fase varia de acordo com a preparação das células doadoras de núcleos em função do tipo de célula e da técnica utilizada para transferência nuclear (Bordignon & Henkes, 2005). Vários tipos celulares têm sido testados, sendo o fibroblasto o modelo mais utilizado, seja obtido por biópsia fetal ou adulto, da pele ou músculo (Chesné, 2006). Este se desenvolve facilmente em cultivo assegurando quantidades inesgotáveis para ser congelado ou modificado geneticamente (Baldassarre *et al.*, 2002; Behboodi *et al.*, 2004) e transfectados (Keefer *et al.*, 2001; Melican *et al.*, 2005). Reggio *et al.* (2001) obtiveram uma taxa de 2,7% de caprinos clonados

transgênicos (5 caprinos/184 embriões transferidos) utilizando fibroblastos fetais de animais transgênicos, similar à taxa obtida por Baguisi *et al.* (1999). Keffer *et al.* (2002) utilizaram células da granulosa obtidas a partir de oócitos de animais transgênicos e obtiveram uma eficiência de 3,5% (8 crias nascidas/ 256 embriões transferidos).

C) Reconstrução embrionária: os dois principais métodos usados para transferir núcleos de células para o interior do citoplasma oocitário são a microinjeção e a fusão entre as membranas plasmáticas das duas células. A maioria das equipes que trabalham com clonagem realiza esta etapa através de eletrofusão (Melican *et al.*, 2005). Porém, cada vez mais se tem utilizado microinjeção do carioplasto no citoplasto com auxílio de impulsos elétricos (Baguisi *et al.*, 1999; Behboodi *et al.*, 2004).

2.2.2 Microinjeção pró-nuclear

A microinjeção da construção de interesse em embriões pró-nucleares é um método tradicional para produção de caprinos transgênicos (Figura 3) sendo os embriões produzidos *in vivo* (Ebert *et al.*, 1991; Baldassarre *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2007) ou *in vitro* (Baldassarre *et al.*, 2003a).

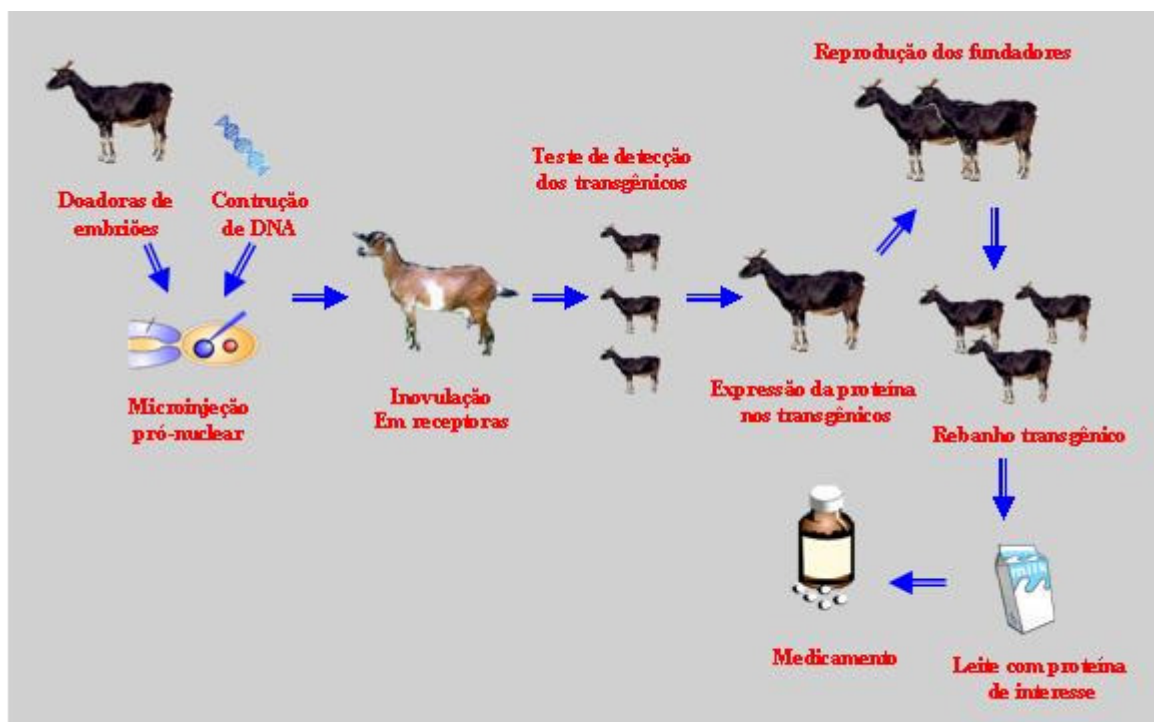


Figura 3 – Fluxograma de produção de caprinos transgênicos por microinjeção pró-nuclear de DNA.

Este método padrão possui como o principal fator limitante a baixa eficiência (geralmente < 10% nas crias nascidas) (Baldassarre, 2008). Além disso, a partir da microinjeção é possível a adição de fragmentos de DNA de até 50 kb (Rulicke & Hubscher, 2000). No entanto, a integração do transgene no genoma hospedeiro é predominantemente aleatória (Clark *et al.*, 2000), o que torna a expressão transgênica, quando presente, de regulação imprevisível. Tal fato é importante, pois a expressão transgênica é influenciada pela localização no DNA genômico.

A microinjeção pró-nuclear de 500-5000 cópias de DNA exógeno ocorre após 15 a 20 h da fecundação (Baldassarre, 2007). Antes da microinjeção, os embriões devem ser centrifugados, pois uma das características dos embriões de ruminantes é a opacidade devido a presença de gotas lipídicas citoplasmáticas. Desta forma, a centrifugação promove a migração periférica dos lipídios facilitando a visualização e a microinjeção pró-nuclear (Collares *et al.*, 2005). Para a realização de microinjeção, também é necessária a utilização do microscópio invertido munido de óptica Nomarski, também denominada DIC (Differential Interference Contrast). Segundo Gootwine *et al.* (1997), somente é possível a visualização pró-nuclear em 30% dos embriões caprinos sem o uso destes acessórios. Com a ajuda dos micromanipuladores, o embrião pró-nuclear é contido enquanto a micropipeta contendo a construção de DNA atravessa a zona pelúcida e realiza a microinjeção em um dos pró-núcleos (Figura 4). Um indicativo do sucesso da microinjeção é a observação de um ligeiro aumento no tamanho do pró-núcleo.

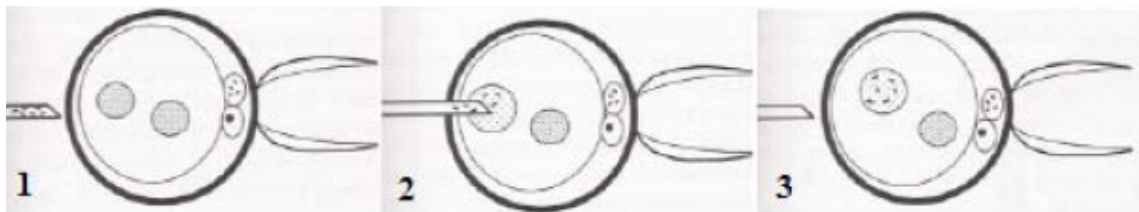


Figura 4 – Etapas da microinjeção pró-nuclear de embriões: (1) Aproximação da pipeta de microinjeção contendo a construção de interesse enquanto o embrião se encontra apreendido pela pipeta “holding”; (2) Microinjeção da construção no pró-núcleo; (3) Após a microinjeção, a pipeta é retirada ao mesmo tempo que o aumento do pró-núcleo recém-microinjetado é verificado. Fonte: Freitas (2005).

2.2.2.1 Produção *in vivo* de embriões

Para a produção *in vivo* de embriões pró-nucleares, as doadoras são submetidas à sincronização do estro, superovulação, fecundação (cobertura ou inseminação artificial) e lavagem do oviduto para recuperação dos presumíveis zigotos (Baldassarre, 2005).

No que se refere à superovulação, esta consiste basicamente em permitir o desenvolvimento até a ovulação de todos os folículos da onda, ao substituir o FSH hipofisário pela administração do FSH exógeno, sendo este um dos momentos determinantes na variabilidade da resposta ovulatória. Durante muitos anos, sobretudo na década de 1980, muitos estudos foram enfocados na investigação se esta variabilidade da resposta seria em decorrência da origem do FSH (hipofisária vs. urinária vs. recombinante), dose de FSH (múltiplas ou única) ou mesmo se a contaminação de LH poderia colaborar para esta variação (Baldassarre, 2008). No entanto, a partir do uso da endoscopia e ultra-sonografia, foi demonstrado que esta variabilidade está relacionada com a população folicular presente no ovário ao iniciar o tratamento superovulatório (Baril, 2006).

A administração exógena de FSH apresenta dois problemas básicos. Primeiramente, o FSH atua somente nos folículos recrutados, ou seja, aqueles que já tenham iniciado seu crescimento. Desta maneira, a quantidade de folículos estimulados pelo FSH depende da quantidade daqueles recrutados no momento inicial da administração deste hormônio. Já a segunda limitação, diz respeito à estimulação tanto de folículos atrésicos quanto daqueles em pleno desenvolvimento (González-Bulnes *et al.*, 2004). Assim, o folículo que já tenha iniciado o processo de atresia vai ser estimulado pelo FSH exógeno a recomeçar o desenvolvimento até a ovulação. No entanto, este oócito não seria fecundado ou sofreria degeneração prematura.

Os mecanismos descritos acima explicam os grandes problemas enfrentados quando se trabalha com produção *in vivo* de embriões como a resposta superovulatória indesejada, bem como a colheita de oócitos não fecundados ou degenerados. Com os protocolos convencionais, a população folicular presente no ovário é desconhecida podendo a resposta variar entre 0 a 30 embriões (Baldassarre, 2008).

O ponto de partida para a produção *in vivo* de embriões é a sincronização do estro das doadoras, na qual se realiza geralmente com o uso de progestágenos por 10 (Baldassarre *et al.*, 2004) a 19 dias (Gootwine *et al.*, 1997), que tem por finalidade fazer com que um grupo de fêmeas entre em estro em determinado momento. Os progestágenos utilizados são dispositivos intravaginais impregnados com 300 mg de progesterona – CIDR (Melican & Gavin, 2007; Shin *et al.*, 2008), 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Lee *et al.*, 1997; Freitas *et al.*, 2007) ou 45 mg de acetato de fluorogestona (Freitas *et al.*, 2003), além de implantes auriculares contendo 6 mg de norgestomet (Lee *et al.*, 2000; Melican & Gavin, 2008). Freitas *et al.* (2004), verificaram uma maior produção de embriões pró-nucleares aptos à microinjeção de DNA quando utilizaram tratamento progestágeno com esponjas

intravaginais impregnadas com 45 mg de FGA em comparação com as impregnadas com 60 mg de MAP (75 vs. 45%, respectivamente).

Os princípios da indução da superovulação em caprinos são os mesmos utilizados em bovinos (Ishwar & Memon, 1996) e em geral, utiliza-se gonadotrofina folículo-estimulante sendo administrada a partir de 48 h antecedentes ao término do tratamento progestágeno (Freitas, 2005). Desta maneira, têm se encontrado trabalhos utilizando 120 (Souza *et al.*, 2008) a 200 mg (Freitas *et al.*, 2007) de FSH de origem suína; 5,6 mg de FSH de origem ovina ou até mesmo combinações de FSH e eCG (Shin *et al.*, 2008).

Aliado ao protocolo de superovulação, com o intuito de promover a ovulação, tem sido administrado GnRH (Baldassarre *et al.*, 2004) ou hCG (Shin *et al.*, 2008). Desta maneira, é obtida uma melhor sincronização das ovulações, diminuição da incidência de folículos anovulatórios (císticos) (Baldassarre, 2008) e maior número de embriões no mesmo estágio de desenvolvimento. Baldassarre *et al.* (2004) verificaram uma maior produção de embriões pró-nucleares utilizando um protocolo de administração de GnRH às 36 h do que às 24 h após o término do tratamento progestágeno (Figura 5).

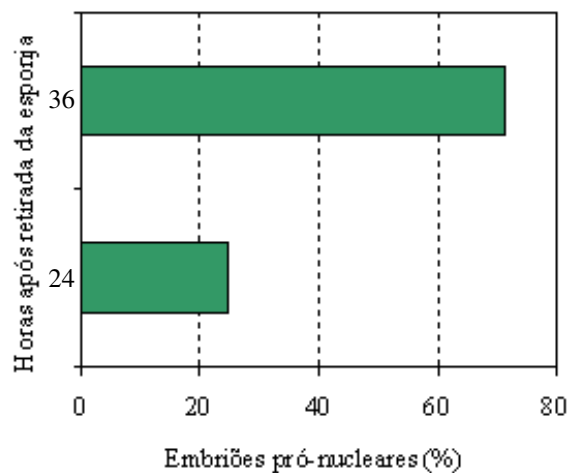


Figura 5 – Porcentagem de embriões pró-nucleares após tratamento com GnRH às 24 e 36 h após o término da tratamento progestágeno. Fonte: Baldassarre *et al.*(2004).

A fecundação pode ser realizada por monta natural ou inseminação artificial (transcervical ou laparoscópica). No entanto, a fecundação ocorre geralmente por monta natural em momentos pré-determinados como às 24 h (Lee *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2008) ou às 36 e 48 h após o término do tratamento progestágeno (Gootwine *et al.*, 1997; Freitas *et al.*, 2007).

No que se refere à recuperação dos embriões pró-nucleares, a maioria dos trabalhos realizados *in vivo* realizam esta etapa por colheita cirúrgica devido à necessidade de realizar uma lavagem ovidutária. Este momento varia, podendo ocorrer das 66 a 68 h (Lee *et al.*, 2000); 72 h (Baldassarre *et al.*, 2004); 77 a 80 h (Gootwine *et al.*, 1997) após o término do tratamento progestágeno. Desta maneira, os referidos autores obtiveram 41, 46 e 79% de recuperação de embriões pró-nucleares, respectivamente. Neste procedimento, o trato reprodutivo da fêmea é exteriorizado, inserido um cateter na junção útero-tubárica, sendo realizada uma lavagem retrógrada e o lavado recuperado através de uma cânula plástica no infundíbulo (Freitas *et al.*, 2007).

2.2.2.2 Produção *in vitro* de embriões

Com a produção *in vitro* de embriões (PIV), surgiram novas possibilidades de produção de progênie a partir de animais pré-púberes, senis, gestantes e post-mortem (Cognié & Poulin, 2006). Além disso, trata-se de uma ferramenta útil para produção e propagação de caprinos transgênicos.

Os métodos de PIV para produção de embriões pró-nucleares envolvem as seguintes etapas: colheita de oócitos a partir de folículos antrais, MIV, fecundação dos oócitos maturados com sêmen capacitado e observação de formação dos pró-núcleos após 15 a 20 h da FIV para posterior microinjeção de DNA.

Os oócitos têm sido, geralmente, recuperados por colheita oocitária guiada por COL, a partir de fêmeas previamente tratadas hormonalmente para estimulação ovariana, a qual visa aumentar o número de folículos disponíveis para a aspiração e de oócitos recuperados por ovário. A taxa de recuperação oocitária obtida depende da técnica adotada, tamanho do folículo, idade do animal e de seu estado reprodutivo (Cognié, 1999). Baldassarre *et al.* (2003a), utilizando a técnica de COL verificaram o efeito da idade em fêmeas transgênicas pré-púberes, obtendo taxas de transgênicos bastante satisfatórias, não sendo observadas diferenças significativas entre animais de, aproximadamente, 3 a 6 meses de idade (Tabela 3)

O sistema mais comumente empregado para a maturação de oócitos é a utilização do Meio de Cultivo de Tecido 199 (TCM-199) suplementado com FSH, LH e estradiol, fatores de crescimento, soro de cabra em estro, soro fetal bovino, albumina sérica bovina e cisteamina (Cognié & Poulin, 2006). A MIV em caprinos é geralmente realizada em gotas de 50 µL de meio a 39°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 24-27 h (Baldassarre & Karatzas, 2004).

Tabela 3 – Efeito da idade da cabra no momento da COL sobre os parâmetros mais importantes na eficiência da COL/FIV.

Parâmetros / Idade na COL	< 100 dias de idade	> 180 dias de idade	Valor de P
Nº de doadoras	5	5	n/a
Média de folículos aspirados	57,0 ± 16,0	28,0 ± 5,0	< 0,05
Média de folículos recuperados	41,0 ± 9,0	25,8 ± 6,0	< 0,05
Embriões transferidos (ET)	139	105	n/a
ET / oócitos recuperados	67,8 %	81,4%	< 0,01
Receptoras inovuladas	23	15	n/a
Prenhez inicial (%)	9 (40%)	12 (80%)	< 0,05
Perdas de prenhez	1 (11%)	0	ns
Crias nascidas (média/receptora)	15 (1,9)	27 (2,2)	
Morte perinatal	3	1	n/a
Crias transgênicas (%)	13 (87%)	20 (74%)	n/a

Fonte: Baldassarre *et al.* (2003a).

Na FIV, ocorre a interação entre o oócito maturado com os espermatozóides previamente capacitados. Esta etapa pode ser realizada com sêmen fresco ou congelado, sendo a seleção dos espermatozóides efetuada por meio de um gradiente de percoll (45%/90%) (Bernardi, 2005). Além disso, sêmen de animais transgênicos pode ser utilizado, pois segundo Baldassarre *et al.* (2002), foi possível obter progênie de machos transgênicos de 5 meses de idade (Tabela 4).

Tabela 4 – Produção *in vitro* de embriões utilizando sêmen de bodes transgênicos de 5 meses de idade.

Parâmetro	Resultado
Oócitos utilizados	242
Estruturas fecundadas	129
Receptoras inovuladas	21
Taxa de fertilidade	14 (67%)
Crias nascidas	17
Taxa de transgênicos	6 (35%)

Fonte: (Baldassarre *et al.*, 2002).

A capacitação espermática é promovida em meio suplementado com soro de cabra em estro a 39°C (Cognié & Poulin, 2006). Assim, os espermatozóides devidamente capacitados e os oócitos previamente maturados são cultivados em meio de fecundação sob uma atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5 °C, por 17 horas (Cognié *et al.*, 2003). Decorrido o período de 15 a 20

horas após a FIV, a formação dos pró-núcleos é observada para realização da microinjeção (Goldman *et al.*, 2002a).

2.2.2.3 Produção *in vivo* x *in vitro* de embriões

A produção *in vivo* de embriões ainda resulta em respostas variáveis quanto à produção de embriões aptos à microinjeção, devido à falhas entre a sincronização de estro e ovulação culminando em estádios embrionários variáveis de desenvolvimento. Além disso, a recuperação embrionária por via cirúrgica limita o número de colheitas por doadora devido a formação de aderências no trato reprodutivo das fêmeas (Baldassarre *et al.*, 2004). Neste sentido, com o intuito de superar as limitações presentes na produção *in vivo* de embriões tem sido utilizada técnica de COL que, após a recuperação, os oócitos são submetidos à MIV, FIV e CIV.

Baldassarre (2005) descreve as taxas de transgênese e de zigotos microinjetados oriundos de produção *in vivo* ou *in vitro* (Tabela 5). Diferentemente do encontrado por Krimperfort *et al.* (1991) em bovinos, não foram descritas diferenças nesta comparação. Além disso, os dados desta tabela indicam que das 326 crias nascidas, apenas 20 eram transgênicas (6%), demonstrando a baixa eficiência do sistema.

Tabela 5 – Taxa de transgênese a partir de microinjeção pró-nuclear de embriões obtidos de produção *in vivo* e *in vitro*.

Parâmetros	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Embriões microinjetados e transferidos	706	2001
Número de receptoras	186	311
Fertilidade ao parto (%)	100 (54%)	157 (50%)
Crias nascidas	115	211
Crias transgênicas (% de crias nascidas)	5 (4%)	15 (7%)
Crias transgênicas (% de zigotos)	0,7%	0,7%

Fonte: Baldassarre (2005).

Huang *et al.* (2001), objetivando melhorar a taxa de transgênicos, utilizaram a técnica de PCR para verificar a integração do DNA exógeno em embriões pró-nucleares biopsiados antes de serem transferidos para as receptoras. Desta maneira, um menor número de

receptoras são requeridas ocorrendo uma diminuição dos custos para obtenção de animais transgênicos (Tabela 6).

Tabela 6 – Taxas de integração e receptoras requeridas.

Parâmetro	Embriões		
	Biopsiados	Não biopsiados	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Cabras doadoras	10 pares de ovários		23
Receptoras	32	33	72
Embriões transferidos	37	65	144
Cabras prenhes	19	20	34
Taxa de prenhez	60 % (19/32)	61% (20/33)	47% (34/72)
Número de abortos	14	4	4
Crias nascidas	6	16	30
Crias vivas	4	16	30
Crias transgênicas	4	2	2
Taxa de integração	100 %	12,5 %	6,6 %
Receptoras requeridas	8 (32/4)	16,5 (33/2)	36 (72/2)

Fonte: Huang *et al.* (2001).

3 JUSTIFICATIVA

A transgênese para produção de animais biorreatores representa uma ferramenta promissora para a biomedicina através da produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico. Tais proteínas podem ser obtidas através da engenharia genética a partir de diversos sistemas de expressão. A expressão destas proteínas no leite de mamíferos consiste numa alternativa diante de outros sistemas convencionais devido à possibilidade de produção em larga escala, além de obtenção de padrão de glicosilação e modificações pós-traducionais corretos.

A espécie caprina tem representado um excelente modelo de transgênese dentre os diversos mamíferos utilizados como biorreatores. A produção de animais fundadores e custos operacionais são, significativamente, inferiores quando se compara com a espécie bovina. Além disso, um pequeno número de exemplares de caprinos transgênicos pode suprir a demanda para a maioria das proteínas recombinantes requeridas no mercado.

A produção de caprinos transgênicos tem sido realizada, classicamente, por microinjeção pró-nuclear de embriões produzidos *in vivo*. Desta maneira, a produção de embriões pró-nucleares do ponto de vista quanti-qualitativo é fundamental para contribuir no aumento das chances de obtenção de transgênicos. Neste contexto, com a utilização de uma raça naturalizada, assim como a Canindé, em comparação com uma raça exótica, como a Saanen, permitirá verificar a eficiência das mesmas quanto à produção quanti-qualitativa de embriões viáveis à microinjeção de DNA. Além disso, aliada à alternativa de introdução de caprinos naturalizados em um programa de transgênese implicará numa diminuição de custos no que diz respeito à produção de transgênicos e, ainda, a preservação da raça Canindé pode ser favorecida.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A raça Canindé é mais eficiente para a produção quanti-qualitativa de embriões pró-nucleares, quando comparada a raça Saanen em um programa de transgênese caprina.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Realizar um estudo comparativo quanto à produção de embriões pró-nucleares viáveis à microinjeção de DNA entre uma raça naturalizada (Canindé) e uma raça exótica (Saanen).

5.2 Objetivos Específicos

- Verificar o comportamento das duas raças no que se refere à resposta ovulatória e número de embriões pró-nucleares produzidos;
- Comparar as características morfométricas destes embriões pró-nucleares;
- Comparar a qualidade da microinjeção de DNA nos embriões pró-nucleares das duas raças estudadas.

6 CAPÍTULO 1

Produção de embriões pró-nucleares em caprinos Canindé e Saanen para microinjeção de DNA

(Pronuclear embryo yield in Canindé and Saanen goats to DNA microinjection)

Enviado para: Theriogenology (submetido em outubro de 2008)

Fator de Impacto: 1, 911

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da raça da doadora sobre a produção de embriões pró-nucleares para serem utilizados na microinjeção de DNA em um programa de transgênese caprina. Doze cabras Canindé e 12 Saanen tiveram o estro sincronizado utilizando esponjas intravaginais por 10 dias e d-cloprostenol no oitavo dia. As doadoras receberam 120 mg (Canindé) ou 200 mg (Saanen) de NIH-FSH-P1 administrado duas vezes ao dia em doses decrescentes por três dias, começando 48 h antes da retirada da esponja. Todas as fêmeas receberam uma injeção de GnRH às 36 h após a retirada da esponja. A recuperação embrionária foi realizada por lavagem ovidutária. Os embriões foram microinjetados com uma construção de DNA contendo o gene hG-CSF e a qualidade da microinjeção foi avaliada subjetivamente. Os seguintes parâmetros foram mensurados em cada embrião: diâmetro total, diâmetro do citoplasma, espessura da zona pelúcida e diâmetro pró-nuclear. A taxa de ovulação foi maior ($P < 0,05$) na raça Saanen ($24,5 \pm 11,7$) do que na Canindé ($11,8 \pm 7,0$). Foi observada uma porcentagem maior ($P < 0,05$) de estruturas fecundadas na raça Saanen (36,2%) em relação à raça Canindé (89,9%). As doadoras Canindé também produziram uma porcentagem maior ($P < 0,05$) de embriões pró-nucleares quando comparadas às Saanen: 72,5% vs. 20,6%, respectivamente. A microinjeção foi avaliada como boa em 96,7% e 73,3% das vezes em embriões Canindé e Saanen, respectivamente ($P < 0,05$). Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas para os parâmetros morfométricos, exceto para o diâmetro do citoplasma. Em conclusão, doadoras da raça Canindé foram mais eficientes do que aquelas da raça Saanen quanto à produção de embriões pró-nucleares utilizadas em programa de transgênese.

Pronuclear embryo yield in Canindé and Saanen goats for DNA microinjection

R.R. Moura^a, E.S. Lopes-Junior^b, D.I.A. Teixeira^a, I.A. Serova^c, L.E. Andreeva^d, V.J.F. Freitas^{a,*}

^a *Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, Brazil*

^b *Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, Brazil*

^c *Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^d *Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*Corresponding author: Vicente José de Figueirêdo Freitas
Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução
Universidade Estadual do Ceará - Faculdade de Veterinária
Av. Dedé Brasil, 1700 – Fortaleza, CE, 60.740-903, Brazil
Tel.: +55 85 3101 9861
Fax: +55 85 3101 9840
E-mail address: vjff@pq.cnpq.br (V.J.F. Freitas)

Abstract

The objective of this study was to examine the effect of donor breed on pronuclear-stage embryo yield to be used for DNA microinjection in a transgenesis goat program. Twelve Canindé and 12 Saanen goats were heat-synchronized using vaginal sponges for 10 days and d-cloprostenol on the eighth day. Donors received 120 mg (Canindé) or 200 mg (Saanen) of NIH-FSH-P1 given twice daily in decreasing doses over three days starting 48 h before sponge removal. All goats received an injection of GnRH at 36 h after sponge removal and they were hand-mated at 36 and 48 h after sponge removal. Embryo recovery was performed by oviduct flushing. Embryos were microinjected with a DNA construct containing the hG-CSF gene and the quality of microinjection was evaluated subjectively. The following parameters were measured for each embryo: total diameter, cytoplasm diameter, zona pellucida thickness and pronuclei diameter. The ovulation rate was higher ($P < 0.05$) in

Saanen (24.5 ± 11.7) than Canindé (11.8 ± 7.0) breed. It was observed a higher ($P < 0.05$) percentage of fertilized ova in Canindé (89.9%) than Saanen (36.2%). Also Canindé donors produced a higher percentage ($P < 0.05$) of pronuclear embryos when compared to Saanen: 72.5% vs 20.6%, respectively. Microinjection was evaluated as good in 96.7% and 73.3% of times in Canindé and Saanen embryos, respectively ($P < 0.05$). Significant differences ($P < 0.05$) were observed for all morphometric parameters except for cytoplasm diameter. In conclusion, Canindé donors were more efficient than Saanen in yield of pronuclear-stage embryo used in a transgenesis goat program.

Keywords: Goat; Pronuclear embryo; DNA microinjection; Transgenesis; Local breed.

1. Introduction

In the last years, the production of recombinant proteins of pharmaceutical importance in the milk of farm animals has attracted interest due to the high capacity of mammary gland cells for protein synthesis [1-3]. Therefore, animal transgenesis is an advantageous alternative for the production of recombinant proteins when compared to other conventional systems due to the possibility of production on a large scale, correct patterns of glycosylation and post-translational modifications, very low costs, possibility of propagation of transgenic donors and demonstration of high stability of expression [4].

Goats have been utilized as bioreactors due to their relatively short gestation period and to the low cost of maintenance when compared to cattle [5]. Various studies have already been conducted to obtain transgenic goats [6-8], as well as having confirmed the feasibility of the technique for large-scale production [9,10]. In addition, with the commercial release for the clinical use of human anti-thrombin (Atryn[®]), transgenic technology has been validated as an efficient method for the production of recombinant proteins for therapeutic use through the use of bioreactor goats [9,11].

In goats, one of the methods most frequently utilized for the production of transgenic offspring is the microinjection of the construct of interest in pronuclear embryos produced *in vivo* [6-8]. In this method, donor goats are submitted to estrus synchronization, superovulation, mating or artificial insemination and oviduct flushing for the recovery of the presumable zygotes. The efficient production and quality of pronuclear stage embryos is essential for the success of a transgenesis program.

In Brazil, the great majority of naturalized goats are endangered, for example, the breeds Canindé, Moxotó, Marota and Repartida [12]. These animals are passed over in favor

of exotic breeds, especially the Saanen breed, because they do not achieve high levels of production. However, these goats are well adapted to semi-arid climate conditions and need to be preserved to favor biodiversity [13]. Among the above-mentioned naturalized breeds, Canindé stands out because of its better dairy performance in comparison with the others [14]. One of the ways to develop interest in this breed would be to utilize it in transgenesis programs, enhancing economic and scientific value at the same time.

Thus, the aim of this work was to carry out a comparative study between Saanen and Canindé goats with regard to the quantitative and qualitative production of pronuclear embryos to be utilized for DNA microinjection in a transgenesis program.

2. Material and methods

2.1. Ethics

This work was approved by the Committee of Ethics in the Use of Animals of the Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE, no. 12/2005) and by Brazil's National Technical Committee of Biosafety (CTNBio, no. 694/2006). All procedures were performed in accordance with the guidelines of animal care [15].

2.2. Location and experimental animals

The experiment was conducted in the Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, located in Fortaleza, Ceará, Brazil, at 3°47'38" S and 38°33'29" W. Embryo donors were cycling females of the Canindé (n = 12) and Saanen (n = 12) breeds with age varying between one and four years. At the start of the experiment, mean weight (\pm SD) for the respective breeds was 27.3 ± 4.1 and 44.5 ± 10.5 kg. It was used bucks of the Canindé (n=2) and Saanen (n=2) breeds with age varying between three and four years, which were selected based on a clinical and andrological examination, in addition to proven fertility. All animals were maintained in a semi-intensive system, receiving Tifton hay (*Cynodon dactylon*) in pens and having daily access for six hours to pasture of this grass. In addition, the animals were supplemented with commercial concentrate (minimum of 20% crude protein) and had free access to water and mineral salt.

2.3. Hormonal treatment, detection of estrus and fertilization

Estrus synchronization was obtained by the use of intravaginal sponges impregnated with 60 mg of MAP (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) for 10 days and an i.m.

injection of 50 µg of d-cloprostenol (Ciosin, Coopers Brazil Ltda., São Paulo, Brazil) in the morning of the eighth day. Forty-eight hours before the sponge removal, superovulatory treatment was initiated, using i.m. injections of 120 mg (Canindé) or 200 mg (Saanen) of NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Vetrepharm, Ontario, Canada), divided into six decreasing doses at 12 h interval (30/30; 15/15; 15/15 mg and 40/40; 40/40; 20/20 mg, respectively). These doses were determined in previous works carried out in our laboratory [16,17]. The sponges were removed at the time of the fifth pFSH injection. In addition, the animals were given 100 µg of GnRH i.m. (Fertagyl, Intervet, Boxmeer, Holland) at 36 h after the sponge removal. Estrus was detected at 12 h after sponge removal and in intervals of four hours. The Canindé and Saanen donors were fertilized at 36 and 48 h after sponge removal by mating using bucks of the respective breeds.

2.4. Ovarian response and embryo recovery

Immediately before embryo recovery, ovulatory response was verified by laparoscopy [18]. The females that showed at least five *corpora haemorrhagica* (CHs) were classified as responsive to superovulatory treatment and were chosen for embryo recovery, which occurred approximately 72 h after sponge removal. All females were submitted to food and water fasting for 24 h before embryo recovery. The donors were sedated by a combination of 2% xylazine hydrochloride (Coopazine, Coopers Brazil Ltda., São Paulo, Brazil) and 10% ketamine hydrochloride (Ketamina Agener, União Química, São Paulo, Brazil). In addition, a total i.v. anesthesia was performed with the above agents plus guaiaicol glyceryl ether (Guaifenesina, Henripharma, São Paulo, Brazil) and injected in a glycophysiological solution. A medial-ventral incision was made and the reproductive tract was exposed. The number of CHs was verified for later determination of recovery rate. The embryo recovery was performed by oviduct flushing utilizing a 14 ga x 1.88 in catheter (Angiocath, BD, Belo Horizonte, Brazil), inserted in the utero-tubal junction and connected to a syringe containing 20 mL of flushing medium (DMPBS flush, Nutricell, São Paulo, Brazil). A plastic cannula (Tom cat, Kendall, Mansfield, USA) was inserted in the infundibulum for flushing recovery into to a Petri dish (Corning, New York, USA).

2.5. Evaluation of recovered embryos and microinjection

Just after the recovery, the flush was observed with a stereomicroscope (Nikon SMZ-800, Kawasaki, Japan) to embryo search at magnifications of 10 to 20x. After this first evaluation, the ovas found were observed with an inverted microscope (Nikon TE2000,

Kawasaki, Japan) for a qualitative evaluation. All presumable zygotes were submitted to centrifugation (12,100 X g for 4 to 6 min) to better visualize the pronuclei. The pronuclear embryos were placed in drops of M16 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell, Campinas, Brazil). Microinjection was performed with an inverted microscope equipped with DIC and a pair of micromanipulators (Narishige, Tokyo, Japan). The DNA construct utilized contained the gene for human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) fused to both goat and bovine DNA sequences of α s1-casein gene [8]. Noticeable swelling of the nuclei was the criterion for successful microinjection. The quality of the microinjection was evaluated always by the same operator on a subjective scale and classified as good, regular or poor based on the visualization and ease of the microinjection.

2.6. Measurements of pronuclear embryos

The most of microinjected embryo was photographed with a digital camera (Nikon DS-SM, Kawasaki, Japan) coupled to an inverted microscope. Later, the photographs were evaluated by the Image J software (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), and the following measurements were made: total diameter, cytoplasm diameter, thickness of the zona pellucida, and diameter of each pronucleus.

2.7. Statistical analysis

The Statistica Advanced DX 7.0 software (Statsoft, Tubra, USA) was utilized for statistical analyses. The parameters related to estrus, ovulation rate, total number of recovered ovas and data with respect to embryo measurements were analyzed by a non-paired Student's *t*-test. The different data expressed in percentage were evaluated by the chi-square test or Fisher's exact test when appropriate. The data were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

One Canindé goat was removed from the experiment, because it showed an ovarian pathology visualized at the time of laparoscopy. Concerning the beginning of estrus, it was observed that Saanen goats showed earlier estrus ($P < 0.05$) than Canindé goats: 17.7 ± 5.2 h vs 26.8 ± 7.6 h. Both breeds studied showed an elevated percentage of females in estrus and superovulating (100.0% and 90.9% for Saanen and Canindé, respectively). However, the Saanen goats showed a higher ovulation rate ($P < 0.05$) when compared to the Canindé goats (24.5 ± 11.7 vs 11.8 ± 7.0 CHs, respectively).

After oviduct flushing, there was no significant difference ($P > 0.05$) with respect to the recovery rate, which was 69.6% and 85.2% for the Saanen and Canindé donors, respectively. This recovery rate led to a significantly higher mean number of recovered ovas ($P < 0.05$) in the Saanen breed (16.6 ± 9.2) when compared to the Canindé goats (9.9 ± 6.1).

The results for the stage of development of embryos and fertilized ovas are summarized in Table 1. It can be seen that Canindé donors were better ($P < 0.05$) than Saanen ones with respect to the percentage of fertilized ovas and of pronuclear embryos.

Table 1 – Effect of breed on the stage of development of embryos recovered.

Breed	Pronuclear	2-4 cells	Unfertilized ova	Total
Canindé	79 (72.5) ^a	19 (17.4) ^a	11 (10.1) ^a	109
Saanen	41 (20.6) ^b	31 (15.6) ^a	127 (63.8) ^b	199
Total	120	50	138	308

Values are expressed as absolute frequency and relative percentage (in parentheses). Values within the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.0001$).

Still with regard to the recovered ovas, a positive correlation was observed between the number of CHs and the number unfertilized ova in Saanen goats ($r = 0.8335$; $P < 0.05$). However, this correlation was not observed in the Canindé breed (Fig. 1).

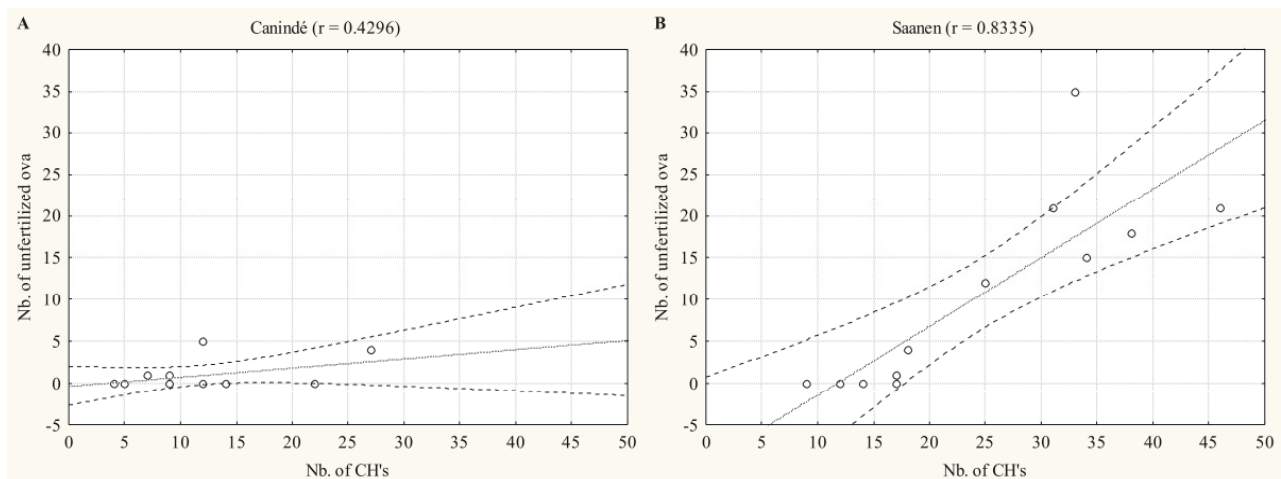


Fig. 1 – Correlation between the number of CHs and unfertilized ova in Canindé (A) and Saanen (B) goats.

After brief centrifugation, the zygotes of both breeds clearly showed the two pronuclei and were used directly for microinjection. In total, 91 embryos were microinjected, where 30

were of the Saanen breed and 61 of the Canindé breed. Details of the embryo pronuclear microinjection of the two breeds are shown in Fig. 2.

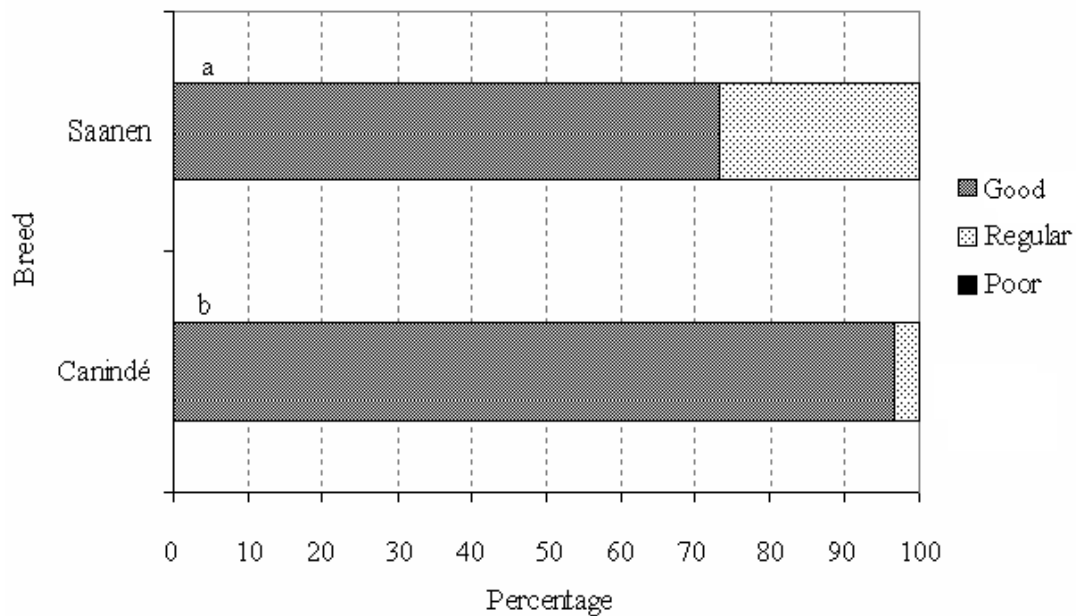


Fig. 2 – DNA microinjection in pronuclear embryos recovered from Canindé (A) and Saanen (B) goats (X 300).

Significant differences were seen with regard to the quality of the microinjection ($P < 0.05$), whereby it was classified as good in 96.7% of the times in Canindé embryos and 73.3% in those from Saanen donors (Fig. 3).

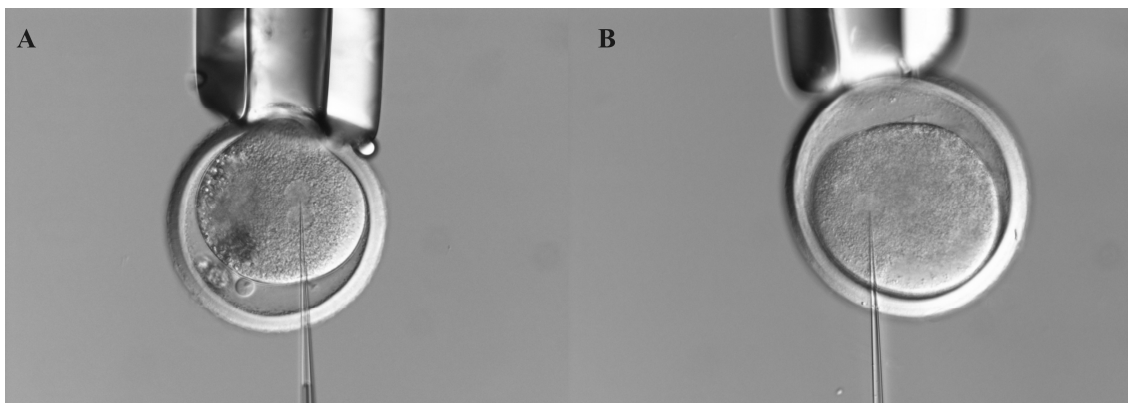


Fig. 3 – Microinjection quality (good, regular or poor) in pronuclear embryos recovered from Canindé and Saanen goats (a,b: $P < 0.05$).

Table 2 presents the values referring to morphometric aspects of the pronuclear embryos for the two breeds. Significant differences ($P < 0.05$) were observed for all parameters examined, with the exception of cytoplasm diameter.

Table 2 – Effect of breed on the morphometric characteristics of pronuclear embryos.

Breed	Total diameter	Cytoplasm diameter	Zona pellucida thickness	1 st PN diameter	2 nd PN diameter
Canindé	158.09 ± 22.16 ^a	120.18 ± 16.89 ^a	10.79 ± 2,56 ^a	19.89 ± 1.87 ^a	16.43 ± 3.21 ^a
Saanen	171.04 ± 4.68 ^b	128.47 ± 5.93 ^a	12.63 ± 1.83 ^b	22.83 ± 2.36 ^b	19.53 ± 1.35 ^b

PN: pronucleus

Values within the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

4. Discussion

The present study examined the likely effect of donor breed on the quanti-qualitative production of pronuclear embryos in exotic (Saanen) and naturalized (Canindé) goats in Brazil. The results regarding females in estrus and superovulating and ovulation rate, as well as the recovered ovas, fertilized and in the pronuclear stage, were compared with data reported by other authors.

The response relative to the number of animals in estrus is in accordance with the majority of the studies that employed similar treatments for the two breeds [16,17]. However, in regard to the time of beginning of estrus, our study showed that the Saanen breed initiated estrus, in relation to the end of hormonal treatment, much earlier than that cited in the literature [16,19].

A high percentage of superovulating females was observed for both breeds studied, even though it was established that a female needed to have a minimum of five ovulations to be considered responsive to the superovulatory treatment. The females of the Saanen breed had an elevated superovulatory response, which can be related to the early beginning of estrus. This correlation has also been described earlier in goats, where animals that showed a short interval between the end of progestagen treatment and the beginning of estrus also demonstrated a high ovulation rate [19].

Due to the objectives of the present study, embryo recovery was carried out by the surgical procedure in order to do an oviduct flushing and obtain ovas that were recently fertilized and in the initial stage of development. In our study, the recovery rate was similar to that of earlier studies utilizing the same method in goats [4,5,8,20,21]. The main disadvantage of the method utilized for the pronuclear embryo recovery is the formation of surgical adhesions in the donors. Improvements in the efficacy of the production of pronuclear embryos have been proposed in some studies with goats [10,22]. These improvements are based on DNA microinjection in zygotes produced after *in vitro* maturation and fertilization of immature oocytes recovered by laparoscopy in goats previously stimulated with gonadotrophins. This method offers the possibility of recovering a rather large number of oocytes per donor (av. approximately 13 oocytes/donor) providing a better control of the embryo developmental stage, besides utilizing a less traumatic surgical method in the donor, in the case of laparoscopy. This technique also allows the recovery procedure to be repeated several times in the same donor. However, due to the high cost of the laparoscopic equipment and the ability required for the procedure, it is

foreseeable that microinjection of *in vivo* produced zygotes will remain a common method for transgenic goat production.

After oviduct flushing, donor Saanen goats were found to have a high number of unfertilized ova correlating positively with the number of ovulations. According to Cognié et al. [23], a significant decrease in the rate of fertilization and transferable embryos was found in Lacaune ewes with elevated superovulatory response (> 30 ovulations). The *in vitro* fertilization of oocytes from these ewes with exacerbated ovulatory response could be achieved if these oocytes can be normally fertilized. If so, this finding could suggest that in the *in vivo* condition, the sperm transport through the ampullary-isthmus junction up to the oviduct is impaired when submitted to this extreme condition. In agreement with this last assertion, there are some studies demonstrating the deleterious effect of superovulation on sperm transport in the female genital tract. Thus, ewes with elevated ovulatory response show low fertilization rates, even after two or three inseminations, due to the reduced transport of the sperm through the cervix [24,25]. Therefore, better fertilization rates could be obtained by the direct deposition of the semen in the uterine horns using laparoscopy [26]. Groups that have worked with *in vivo* production of embryos in small ruminants suggest that artificial insemination by laparoscopy should be carried out 48 hours after the progestagen removal, resulting in a an elevated rate of fertilization and low amount of degenerated embryos independent of the number of ovulations. These results indicate that the intrinsic ability of the oocyte to become fertile is not impaired by superovulation with FSH [27].

The positive correlation between number of ovulations and number of unfertilized ova did not exist in the donor goats of the Canindé breed, which were also very efficient with regard to synchronization of stage of development of embryos. These data confirm previous results by our group utilizing the same dose of FSH in Moxotó goats, another Brazilian naturalized breed [17]. Breed is one of the main factors that can affect the superovulatory response in embryo donors, where this genetic factor has already been well identified as one of those that can contribute to the ovulatory variability [28]. In addition, females with high dairy production, such as goats of the Saanen breed, can suffer negative effects on their reproductive performance. In cows, studies have shown antagonist relations between production characteristics and fertility in animals selected for enhanced dairy production [29].

In goats, the effect of GnRH injection to synchronize ovulation and to enhance production of transferable embryos is controversial. In a small-scale study, an increase in ovulation rate and number of transferable embryos was obtained in goats treated with GnRH at 24 and 48 h after progestagen removal [30]. In another study, the authors reported an increase in ovulation rate in goats treated with GnRH, but with a low rate of fertilization [31]. However, in our study, GnRH injection was efficient for aiding in the synchronization of ovulations and promoting a good percentage of embryos in the same stage of development in relation to the pre-determined time for embryo recovery. Thus, at the moment of microinjection, particularly in the Canindé breed, an increased percentage of embryos were in the pronuclear stage or with 2-4 cells. These data are in agreement with those obtained in another study of the *in vivo* production of pronuclear embryos in goats [32]. In this work, the authors obtained a little less than 80% of the embryos recovered between pronuclear stage and the two-cell stage. In transgenesis programs, an essential parameter for success in the production of founder animals is, without a doubt, the attainment of pronuclear embryos, because previous studies have demonstrated that the integration of exogenous DNA occurs more efficiently after the microinjection of embryos in this stage than when carried out in embryos of two cells (reviewed by [33]).

In goat embryos, the pronuclei can be visualized without centrifugation in approximately 30% of the times [34,35]. Thus, it is common to include centrifugation for better visualization of pronuclei by DIC and, consequently, to increase the number of zygotes suitable for microinjection. There are little data in the literature with respect to the morphometry of goat pronuclear embryos, thereby making it difficult to make comparisons with the results obtained in our study. Authors who have studied the ultra-structural characteristics of goat embryos of two cells, produced *in vivo*, determined an approximate thickness of 9.50 μm for the zona pellucida [36]. This result is slightly smaller than that observed in the present study for both breeds; however, this can be explained by the decrease in the thickness of the zona pellucida as the embryo develops [37]. Differences between species in the ease of pronuclear microinjection have been reported. Pronuclei of bovine and ovine embryos are easier to visualize than those of goats [38]. Thus, small morphometric differences associated with a better visualization of the pronuclei could explain the greater ease of microinjection in the embryos of Canindé donors.

In conclusion, donors of the Canindé breed were more efficient than those of the Saanen breed in the pronuclear embryo production. Besides, DNA microinjection was easier in the Canindé

embryos. These data indicate the use of Canindé goats in transgenesis programs, increasing interest in their breeding and contributing to saving them from extinction. However, further experiments are needed to determine the survival rate of these embryos and later rate of transgenic progeny after transfer to recipient goats.

Acknowledgments

The staff of the LFCR is gratefully acknowledged for its help with the animal care. This study was supported by the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, Brazil). Raylene R. Moura is a recipient from a grant of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Vicente J.F. Freitas is a senior research scientist of CNPq. Dr. A. Leyva helped with the translation and editing of the manuscript.

References

- [1] Maga EA, Murray JD. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. *Biotechnol* 1995;13:1452–57.
- [2] Keefer CL. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:5–12.
- [3] Houdebine LM. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim* 2005;40:269–81.
- [4] Kues W, Niemann H. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol* 2004;22:286–94.
- [5] Baldassarre H, Karatzas CN. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* 2004;82–83:255–66.
- [6] Gootwine E, Barash I, Bor A, Dekel I, Friedler A, Heller M, et al. Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. *Theriogenology* 1997;48:485–99.
- [7] Lee CS, Fang NZ, Koo DB, Lee YS, Zheng GD, Oh KB, et al. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegragus*. *Small Rum Res* 2000;37:57–63.
- [8] Freitas VJF, Serova IA, Andreeva LE, Dvoryanchikov GA, Lopes-Júnior ES, Teixeira D.I.A, et al. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *An Acad Bras Cienc* 2007;79:585–92.

- [9] Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, et al. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived anti-thrombin. *Blood* 1998; 91:4561–71.
- [10] Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Guathier M, Neveu N, Lapoint J, et al. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 2003;59: 831–39.
- [11] Yeung PK. Transgenic antithrombin III (Genzyme). *Drugs* 2000;3:669–73.
- [12] Mariante AS, Egito AA. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology* 2002;57:223–35.
- [13] Andrabi SMH, Maxwell WMC. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci* 2007;99:223–43
- [14] Mariante AS, de Bem AR. Animal genetic resources conservation programme in Brazil. In: *Animal Genetic Resources Information*. FAO, 1992, pp. 7–26
- [15] Van Zutphen LFM, Balls M. *Animal Alternatives, Welfare, and Ethics*. Elsevier B.V., 1997, 1260 p.
- [16] Lima-Verde JB, Lopes-Júnior ES, Teixeira DIA, Paula NRO, Medeiros AA, Rondina D, et al. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *S Afr J Anim Sci* 2003;32:127–31.
- [17] Souza AL, Galeati G, Almeida AP, Arruda IJ, Govoni N, Freitas VJF, et al. Embryo production in superovulated goats treated with insulin before or after mating or by continuous propylene glycol supplementation. *Reprod Domest Anim* 2008;43:218–21.
- [18] Oldham CM, Lindsay DR. Laparoscopy in the ewe: a photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrous cycles. *Anim Reprod Sci* 1980;3:119–24.
- [19] Baril G, Vallet JC. Time of ovulations in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. *Theriogenology* 1990;34:303–11.
- [20] Lee CS, Fang NZ, Koo DB, Lee YS, Zheng GD, Oh KB, et al. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegagrus*. *Small Rum Res* 2000;37:57–63.

- [21] Freitas VJF, Serova IA, Andreeva LE, Lopes-Jr ES, Teixeira DIA, Cordeiro MF, et al. Birth of normal kids after microinjection of pronuclear embryos in a transgenic goat (*Capra hircus*) program in Brazil. *Gen Mol Res* 2003;2:200–5.
- [22] Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer CL, Lazaris A, Karatzas CN. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology* 2002;57:275–84.
- [23] Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003;59:171–88.
- [24] Evans G, Armstrong DT. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J Reprod Fertil* 1984;70:47–53.
- [25] Hawk HW, Cooper BS, Conley HH. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology* 1987;28:139–53.
- [26] González-Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, García-Barcía RM, Inskoop EK, et al. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fert Dev* 2004;16:421–35.
- [27] Brebion P, Baril G, Cognié Y, Vallet JC. Embryo transfer in sheep and goat. *Ann Zoot* 1992;41:331–9.
- [28] Bindon BM, Piper LR, Cahill LP, Driancourt MA, O’Shea T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology* 1986;25:53-70.
- [29] Ouweltjes W, Smolders EAA, van Eldik P, Elving L, Schukken YH. Herd fertility parameters in relation to milk production in dairy cattle. *Livest Prod Sci* 1996;46:221–7.
- [30] Akinlosutu BA, Wilder CD. Fertility and blood progesterone levels following LHRH-induced superovulation in FSH-treated anestrus goats. *Theriogenology* 1993;40:895-904.
- [31] Krischer RL, Gwazdauskas FC, Page RL, Russel CG, Casenco RS, Sparks AET. Ovulation rate in FSH-superovulated goats treated with PGF2 α and/or GnRH. *Theriogenology* 1994;41:491-8.
- [32] Baldassarre H, Wang B, Gauthier M, Neveu N, Lazaris A, Karatzas CN. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. *Zygote* 2004;12:257–61.
- [33] Wang B, Yang X. Transgenic Technologies for Animals as Bioreactors in Biotechnology. In: *Encyclopedia of Life Support Systems*, Doelle HW (Ed.), Eolss Publishers, 2002.

- [34] Selgrath JP, Memon MA, Smith TE, Ebert KM. Collection and transfer of microinjectable embryos from dairy goats. *Theriogenology* 1990;34:1195-205.
- [35] Ebert KM, Selgrath JP, DiTulio P, Denman J, Smith, TE, Memon MA, et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technology* 1991;9:835-8.
- [36] Tao Y, Cheng L, Zhang M, Ding J, Zhang Y, Fugui F, et al. Ultrastructural changes in goat interspecies and intraspecies reconstructed early embryos. *Zygote* 2008;16:93–110.
- [37] Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:323–8.
- [38] Niemann H, Döpke HH, Hadelor KG. Production of Transgenic Ruminants by DNA Microinjection. In: *Transgenic Animal Technology*, Pinkert CA (Ed.), Academic Press, 2002, pp. 337–55.

7 CONCLUSÕES GERAIS

As cabras da raça Canindé mostraram-se eficientes quando submetidas à comparação com a raça Saanen no tocante à produção quanti-qualitativa de embriões pró-nucleares.

As diferenças morfométricas encontradas entre os embriões pró-nucleares das raças Canindé e Saanen podem ser responsáveis pela maior facilidade da microinjeção encontrada nos embriões da raça nativa.

Finalmente, a eficiência da raça Canindé em um programa de transgênese pode agregar valor à mesma e contribuir para que haja maior interesse em sua criação, evitando desta forma o seu desaparecimento.

8 PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos neste trabalho, é necessário que outros estudos sejam realizados com o intuito de verificar a taxa de sobrevivência dos embriões microinjetados e a taxa de transgênicos nascidos após transferência para fêmeas receptoras.

Em adição, outras raças naturalizadas podem ser fontes de estudo com os mesmos objetivos deste trabalho.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINLOSUTU, B.A., WILDER, C.D. Fertility and blood progesterone levels following LHRH-induced superovulation in FSH-treated anestrus goats. **Theriogenology**, v.40, p.895-904, 1993.

ANDRABI, S.M.H., MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Anim. Reprod. Sci.**, v.99, p.223-43, 2007.

BAGUISI, A., BEHBOODI, E., MELICAN, D.T., POLLOCK, J.S., DESTREMPES, M.M., CAMMUSO, C., WILLIAMS, J.L., NIMS, S.D., PORTER, C.A., MIDURA, P., PALACIOS, M.J., AYRES, S.L., DENNISTON, R.S., HAYES, M.L., ZIOMEK, C.A., MEADE, H.M., GODKE, R.A., GAVIN, W.G., OVERSTROM, E.W., ECHELARD, Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnol.**, v.17, p. 456-461, 1999.

BALDASSARRE, H. Produção de cabras transgênicas. In: Collares, T. (Org.). **Animais transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005. cap. 10, p.255-272.

BALDASSARRE, H. Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.31, p.274-282, 2007.

BALDASSARRE, H. Tecnologias reprodutivas de última geração. In: AISEN, E.G. (Org.), BICUDO, S.D. **Reprodução ovina e caprina**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2008, cap. 14, p. 179-192.

BALDASSARRE, H., KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.255-266, 2004.

BALDASSARRE, H., WANG, B., KAFIDI, N., KEEFER, C., LAZARIS, A., KARATZAS, CN. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, p. 276-264, 2002.

BALDASSARRE, H., WANG, B., KAFIDI, N., GAUTHIER, M., NEVEU, N., LAPOINTE, J., SNEEK, L., LEDUC, M., DUGUAY, F., ZHOU, J.F., KEEFER, C., LAZARIS, A., KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v.59, p. 831-839, 2003a.

BALDASSARRE, H., KEEFER, C., WANG, B., LAZARIS, A., KARATZAS, C.N. Nuclear transfer in goats using in vitro matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. **Cloning Stem Cells**, v.5, p.279-285, 2003b.

BALDASSARRE, H., WANG, B., GAUTHIER, M., NEVEU, N., LAZARIS, A., KARATZAS, C. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. **Zygote**, v.12, p.257-61, 2004.

BARIL, G. Produção *in vivo* de embriões caprinos e ovinos. In: FREITAS, V.J.F. (Org.) **Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. 1. ed. Fortaleza: Multicor, 2006, cap. 1, p. 7-20, 2006.

BARIL, G., VALLET, J.C. Time of ovulations in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. **Theriogenology**, v.34, p.303–311,1990.

BEHBOODI, E., MEMILI, E., MELICAN, D.T., DESTREMPES, M.M., OVERTON, S.A., WILLIAMS, J.L., FLANAGAN, P.A., BUTLER, R.E., LIEM, H., CHEN, L.H., MEADE, H.M., GAVIN, W.G., ECHELARD, Y. Viable transgenic goats derived from skin cells. **Transgenic Res.**, v. 13, p.215–224, 2004.

BEHBOODI, E., AYRES, S.L., MEMILI, E., O'COIN, M., CHEN, L.H., REGGIO, B.C., LANDRY, A.M., GAVIN, W.G., MEADE, H.M., GODKE, R.A., ECHELARD, Y. Health and reproductive profiles of malaria antigen-producing transgenic goats derived by somatic cell nuclear transfer. **Cloning Stem Cells**, v.7, p.107-118, 2005.

BERNARDI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Sci. Vet.**, v. 33, p.1-16, 2005.

BINDON, B.M., PIPER, L.R., CAHILL, L.P., DRIANCOURT, M.A., O'SHEA, T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. **Theriogenology**, v.25, p.53-70, 1986.

BORDIGNON, V., HENKES, L.E. Clonagem animal: a busca da amplificação de cópias geneticamente modificadas. In: COLLARES, T. (Org.). **Animais transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005. cap. 5, p.137-166.

BREBION, P., BARIL, G., COGNIÉ, Y., VALLET, J.C. Embryo transfer in sheep and goat. **Ann Zoot.**, v.41, p. 331–339, 1992.

CERASOLI, D.M., GRIFFITHS, E.M., DOCTOR, B.P., SAXENA, A., FEDORKO, J.M., GREIG, N.H., YU, Q.S., HUANG, Y., WILGUS, H., KARATZAS, C.N., KOPLOVITZ, I., LENZ, D.E. *In vitro* and *in vivo* characterization of recombinant human butyrylcholinesterase protexia as a potential nerve agent bioscavenger. **Chem. Biol. Interact.**, v.157/158, p.363-365, 2005.

CHESNÉ, P. Métodos de clonagem em caprinos e ovinos. In: FREITAS, V.J.F. (Org.) **Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. 1. ed. Fortaleza: Multicor, 2006, cap. 6, p. 71-84.

CLARK, A.J. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing and production of recombinant proteins. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**, v.3, p.337-350, 1998.

CLARK, A.J., BURL, S., DENNING, C, DICKINSON, P. Gene targeting in livestock: a preview. **Transgenic res.**, v.9, p. 263-275, 2000.

COGNIÉ, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p.109-116, 1999.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**. v.59, p.171-188, 2003.

COGNIÉ, Y., POULIN, N. Produção *in vitro* de oócitos maduros e embriões em caprinos e ovinos. In: FREITAS, V.J.F. (Org.) **Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. 1. ed. Fortaleza: Multicor, 2006, cap. 2, p. 21–29.

COLLARES, T., SEIXAS, F.K. Biorreatores: proteínas recombinantes produzidas a partir de animais transgênicos. In: COLLARES, T. (Org.). **Animais transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005. cap. 7, p.190-208.

COLLARES, T., BONGALHARDO, D.C., DESCHAMPS, J.C., MOREIRA, H.L.M. Transgenic animals: The melting of molecular biology and animal reproduction. **Anim. Reprod.**, v.2, p.11-27, 2005.

DYCK, M.K., LACROIX, D., POTHIER, F., SIRARD, M.A. Making recombinant proteins in animals – different systems, different applications. **Trends Biotechnol.**, v. 21, p. 394–399, 2003.

EBERT, K., SELGRATH, J.P., DITULLIO, P., DENMAN, J., SMITH, T.E., MEMON, M.A. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. **Bio/technology**, v. 9, p.835–838, 1991.

EDMUNDS, T., VAN PATTEN, S.M., POLLOCK, J., HANSON, E., BERNASCONI, R., HIGGINS, E. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived anti-thrombin. **Blood**, v. 91, p.4561–4571,1998.

EGITO, A.A., ALBUQUERQUE, M.S.M., MARIANTE, A.S., Mc MANUS, C., MARQUES, J.R.F. ABREU, U.P.G.S. Caracterização genética de raças naturalizadas. In: Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe - SIRGEALC, 3, **Anais...Caribe**, 2001, p.121-126.

EVANS, G.; ARMSTRONG, D.T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. **J. Reprod. Fétil.**, v.70, p. 47–53, 1984.

FREITAS, V.J.F. Transgênese na espécie caprina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, p. 109-115, 2003.

FREITAS, V.J.F. Embriões pró-nucleares na espécie caprina. Como obtê-los de maneira mais eficiente ? **Rev. Ciênc. Agrár.** Belém, v. 43, p. 21-32, 2005.

FREITAS, V.J.F., SEROVA, I.A., ANDREEVA, E.S., LOPES-JUNIOR, E.S., TEIXEIRA, D.I.A., CORDEIRO, M.F., RONDINA, D., PAULA, N.R.O., ARRUDA, I.J., LIMA VERDE, J.B., DVORIANCHIKOV, G., SEROV, O. Birth of normal kids after microinjection of

pronuclear embryos in a transgenic goat (*Capra hircus*) production program in Brazil. **Gen. Mol. Res.**, v.2, p. 200-205, 2003.

FREITAS, V.J.F., LOPES JUNIOR, E.S., TEIXEIRA, D.I.A., PAULA, N.R.O., RONDINA, D., ARRUDA, I.J., SEROVA, I.A., ANDREEVA, L.I., DIAS, L.B., SEROV, O. Efeito do tipo de progestágeno, durante tratamento de superovulação, sobre a produção de zigotos caprinos destinados à microinjeção de DNA. **Ci. Anim.**, v.14, p 47-51, 2004.

FREITAS, V.J.F., SEROVA, I.A., ANDREEVA, L.E., DVORYANCHIKOV, G.A., LOPES-JÚNIOR, E.S., TEIXEIRA, D.I.A., DIAS, L.P.B., AVELAR, S.R.G., MOURA, R.R., MELO, L.M., PEREIRA, A.F., CAJAZEIRAS, J.B., ANDRADE, M.L.L., ALMEIDA, K.C., SOUSA, F.C., CARVALHO, A.C.C., SEROV, O.L. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.79, p. 585–92, 2007.

GABRIELSEN, A., BHATNAGER, P.R., PETERSEN, K. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.17, p.323–328, 2000.

GOLDMAN, I.L., SADTCHIKOVA, E.L., KADULIN, S.G. Technology of obtaining goat zygotes with known time of formation suitable for microinjection of recombinant DNA in order to create transgenic animals. **Doklady Biol. Sci.**, v. 384, p.195–198, 2002a.

GOLDMAN, I. L., KADULIN, S.G., RAZIN, S.V. Transgenic goats in the world pharmaceutical industry of the 21st century. **Russian J. Gen.**, v.38, p.1-14, 2002b.

GONZALEZ-BULNES, A., BAIRD, D.T., CAMPBELL, B.K., COCERO, M.J., GARCIA-GARCIA, R.M., INSKEEP E.K., LOPEZ-SEBASTIAN, A., MCNEILLY, A.S., SANTIAGO-MORENO, J., SOUZA, C.J., VEIGA-LOPEZ, A. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, p.421-435, 2004.

GOOTWINE, E., BARASH, I., BOR, A., DEKEL, I., FRIEDLER, A., HELLER, M., ZAHARONI, U., ZENUE, A., SHANI, M. Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. **Theriogenology**, v. 48, p. 485-499, 1997.

GORDON, J.W., SCANGOS, G.A., PLOTKIN, D.J., BARBOSA, J.A., RUDDLE, F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 7380-7384, 1980

HAWK, H.W, COOPER, B.S., CONLEY, H.H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. **Theriogenology**, v.28, p.139–153, 1987.

HOUDEBINE, L.M. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. **Reprod. Domest. Anim.**, v.40, p.269–281, 2005.

HUANG, S.Z., HUANG, Y., CHEN, M.J., ZENG, F.Y., REN, Z.R., ZENG, Y.T. Selection of in vitro produced, transgenic embryos by nested PCR for efficient production of transgenic goats. **Theriogenology**, v. 56, p. 545-556, 2001.

ISHWAR, A .K., MEMON, M.A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Rumin. Res.**, v. 19, p. 35–46, 1996.

KARATZAS, C. N., ZHOU, J. F., HUANG, Y., DUGUAY, F, CHRETIEN, N., BHATIA,B., BILODEAU, A., KEYSTON, R., TAO, T. KEEFER, C.L., WANG, B., BALDASSARE, H. Production of recombinant spider silk (BioSteel®) in the milk of transgenic animals. **Transgenic Res.**, v. 8, p. 476–477, 1999.

KEEFER, C.L. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. **Anim. Reprod. Sci.**, v.83, p. 5–12, 2004.

KEEFER, C.L., BALDASSARRE, H., KEYSTON, R., WANG, B., BHATIA, B. BILODEAU, A.S., ZHOU, J.F., LEDUC, M., DOWNEY, B.R., LAZARIS, A., KARATZAS, C.N. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and non-transfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 849–856, 2001.

KEEFER, C.L., KEYSTON, R., LAZARIS, A., BHATIA, B., BEGIN, I., BILODEAU, A.S., ZHOU, F.J., KAFIDI, N., WANG, B., BALDASSARRE, H., KARATZAS, C.N. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. **Biol.Reprod.**, v.66, p.199-203, 2002.

KO, J.H., LEE, C.S., KIM, K.H., PANG, M.G., KOO, J.S., FANG, N., KOO, D.B., OH, K.B., YOUN, W.S., ZHENG, G.D., PARK, J.S., KIM, S.J., HAN, Y.M., CHOI, I.Y., LIM, J., SHIN, S.T., JIN, S.W., LEE, K.K., YOO, O.J. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. **Transgenic Res.**, v.9, n. 3, p.215-22, 2000.

KRIMPERNFORT, P., RADEMAKERS, A., EYSTONE, W. Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. **Biotechnology**, v. 9, p. 844-847, 1991.

KRISCHER, R.L., GWAZDAUSKAS, F.C., PAGE, R.L., RUSSEL, C.G., CASENCO, R.S., SPARKS, A.E.T. Ovulation rate in FSH-superovulated goats treated with PGF_{2α} and/or GnRH. **Theriogenology**, v.41, p.491-498, 1994.

KUES, W., NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends Biotechnol.**, v.22, p. 286–94, 2004.

LEE, W.K., HAN, Y.M., SHIN, S.T., LEE, D.H., YOO, O.J., LEE, K.K. In vitro development of DNA-injected embryos co-cultured with goat oviduct epithelial cells in Korean native goats (*Capra hircus aegagrus*). **Theriogenology**, v. 47, p.1115-1123, 1997.

LEE, C.S., FANG, N.Z., KOO, D.B., LEE, Y.S., ZHENG, G.D., OH, K.B., YOUN, W.S., HAN, Y.M., KIM, S.J., SHIN, S.T., JIN, S.W., LEE, K.S., KO, J.H., KOO, J.S., PARK, C.S, LEE, K.S.,

- YOO, O.J., LEE, K.K. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegragus*. **Small Rumin. Res.**, v.37, p. 57-63, 2000.
- LIMA-VERDE, J.B., LOPES-JÚNIOR, E.S., TEIXEIRA, D.I.A., PAULA, N.R.O., MEDEIROS, A.A., RONDINA, D., FREITAS, V.J.F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. **S. Afr. J. Anim. Sci.**, v.32, p.127–131, 2003.
- MAGA, E.A., MURRAY, J.D. Mammary gland expression of transgenes and the potential for altering the properties of milk. **Biotechnol.**, v.13, p.1452–1457, 1995.
- MAGA, E.A., SHOEMAKER, C.F., ROWE, J.D., BONDURANT, R.H., ANDERSON, G.B., MURRAY, J.D. Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.518–524, 2006.
- MARIANTE, A.S., DE BEM, A.R. **Animal genetic resources conservation programme in Brazil**. In: Animal Genetic Resources Information. FAO, 1992, p. 7–26.
- MARIANTE, A.S., EGITO, A.A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v.57, p.223–235, 2002.
- MELICAN, D., GAVIN, W. Repeat superovulation, non-surgical embryo recovery, and surgical embryo transfer in transgenic dairy goats. **Theriogenology**, v. 69, p. 197–203, 2008.
- MELICAN, D., BUTLER, R., HAWKINS, N., CHEN, L.H., HAYDEN, E., DESTREMPES, M., WILLIAMS, J., LEWIS, T., BEHBOODI, E., ZIOMEK, C., MEADE, H., ECHELARD, Y., GAVIN, W. Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 63, p.1549–1563, 2005.
- MONTOLIU, L., LAVADO, A. Animais transgênicos na biologia, na biomedicina e na biotecnologia. In: COLLARES, T. (Org.). **Animais transgênicos: princípios e métodos**. São Carlos: Suprema, 2005. cap. 4, p.114-136.
- MONTESINO, R., TOLEDO, J.R. La glândula mamaria: biofábrica para la producción de proteínas recombinantes. **B.A.**, v.23, p. 271-278, 2006.
- NIEMANN, H., KUES, W.A. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. **Anim. Reprod. Sci.**, v.79, p.291–317, 2003.
- NIEMANN, H., DÖPKE, H.H., HADELER, K.G. **Production of Transgenic Ruminants by DNA Microinjection**. In: Transgenic Animal Technology, Pinkert CA (Ed.), Academic Press, 2002, p. 337–355.
- OLDHAM, C.M, LINDSAY, D.R. Laparoscopy in the ewe: a photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrous cycles. **Anim. Reprod. Sci.**, v.3, p.119–24, 1980.

OUWELTJES, W., SMOLDERS, E.A.A., VAN ELDIK, P., ELVING, L., SCHUKKEN, Y.H. Herd fertility parameters in relation to milk production in dairy cattle. **Livest. Prod. Sci.** v. 46, p. 221–227, 1996.

PARKER, M.H., BIRCK-WILSON, E., ALLARD, G., MASIELLO, N., DAY, M., MURPHY, K.P., PARAGAS, V., SILVER, S., MOODY, M.D. Purification and characterization of a recombinant version of human alpha-fetoprotein expressed in the milk of transgenic goats. **Protein Expr Purif.** v.38, p.177-183, 2004.

PESQUEIRO, J.B, MAGALHÃES, L.E., BAPTISTA, E.H, SABATINI, R.A. Animais transgênicos. **Biotecnologia**, v. 27, p. 52-56, 2002.

POLLOCK, D.P., KUTZKO, J.P., BIRCK-WILSON, E., WILLIAMS, J.L., ECHELARD, Y., MEADE, H.M. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. **J. Immunol.Meth.**,v.231,p.147-157,1999.

REGGIO, B.C., JAMES, A.N., GREEN, H.L., GAVIN, W.G., BEHBOODI, E., ECHELARD, Y., GODKE, R.A. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 1528–1533, 2001.

RULICKE, T., HUBSCHER, U. Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. **Exp. Physiol.**, v.81, p.589-601, 2000.

SCHMIDT, C. Belated approval of first recombinant protein from animal. **Nature biotechnol.**, v. 24, p.877, 2006.

SELGRATH, J.P., MEMON, M.A., SMITH, T.E., EBERT, K.M. Collection and transfer of microinjectable embryos from dairy goats. **Theriogenology**, v. 34, p.1195-1205, 1990.

SHIN, S.T., JANG, S.K., YANG, H.S., LEE, O.K., SHIM, Y.H., CHOI, W.I.I., LEE, D.S., LEE, G.S., CHO, J.K., LEE, Y.W. Laparoscopy vs. laparotomy for embryo transfer to produce transgenic goat (*Capra hircus*). **J. Vet. Sci.**, v.9, p. 103-107, 2008.

SOUZA, A.L., GALEATI, G., ALMEIDA, A.P., ARRUDA, I.J., GOVONI, N., FREITAS, V.JF., RONDINA, D. Embryo production in superovulated goats treated with insulin before or after mating or by continuous propylene glycol supplementation. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 43, p.218–221, 2008.

TAO, Y., CHENG, L., ZHANG, M., DING, J., ZHANG, Y., FANG, F., ZHANG, X., MADDOX-HYTTEL, P. Ultrastructural changes in goat interspecies and intraspecies reconstructed early embryos. **Zygote**, v.16, p. 93–110, 2008.

VAJTA, G., GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. **Anim. Reprod. Sci.**, v.92, p. 211–230, 2006.

VAN ZUTPHEN, L.F.M.; BALLS, M. **Animal Alternatives, Welfare, and Ethics**. Elsevier B.V., 1997, 1260 p.

WALL, R.J., HAWK, H.W., NEL, N. Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. **J. Cell. Biochem.** v.49, p.113–20, 1992.

WANG, B., YANG, X. **Transgenic Technologies for Animals as Bioreactors in Biotechnology**. In: Encyclopedia of Life Support Systems, Doelle HW (Ed.), Eolss Publishers, 2002.

WHEELER, M., LIMA, A.S., MLAUSKY, S.A., DAVIDSON, T., FERGUNSON C.E., MELLO, M.R.B. Produção de animais transgênicos nas espécies domésticas In: GONÇALVES, P.B., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. cap. 19, p. 365-292.

YEUNG, P.K. Transgenic antithrombin III (Genzyme). **Idrugs**, v.3, p.669–673, 2000.

YOUNG, M.W., MEADE, H., CURLING, J.M., ZIOMEK, C.A., HARVEY, M. Production of recombinant antibodies in the milk of transgenic animals. **Res. Immunol**, v.149, p.609-610, 1998.

ZHANG, J., LAO, W., CHENG, G. Expression of HBsAg gene in transgenic goats under direction of bovine α s1-casein control sequence, **China J. Biotechnol.**, v. 13, p.99–104, 1997.

ZHANG, J., LIN, L., YINFENG, C., XUJUN, X., JUAN, C., YOUNG, W. B., HUIQING, Y., GUOHUA, Y., SIGUO, L., AIMIN, Z., JIANQUAN, C., GUOXIANG C. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats. **Protein. Expr. Purif.**, v. 57, p.127–135, 2008.

ZHOU, Q., KYAZIKE, J., ECHELARD, Y., MEADE, H.M., HIGGINS, E., COLE, E.S., EDMUNDS, T. Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats. **J. Biotechnol.**, v.117, p.57-72, 2005.

10 ANEXOS

ANEXO I

RESUMO PUBLICADO: Production of microinjetable embryos in native goats of Northeastern Brazil.

I Simpósio Internacional de Tecnologia Transgênica
Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP.
10 a 12 de março/2008

Production of microinjetable embryos in native goats of Northeastern Brazil

Moura, R.R.^{1*}, Soares, D.H.¹, Cajazeiras, J.B.¹; Almeida, L.L.¹; Luz, J.V.¹; Avelar, S.R.G.¹; Alcantara Neto, A.S.¹; Albuquerque, E.S.¹; Lopes-Junior, E.S.²; Teixeira, D.I.A.¹, Serova, I.A.³, Andreeva, L.E.⁴, Dias, L.P.B.⁵, Freitas, V.J.F.¹

¹Laboratory of Physiology and Control of Reproduction-LFCR, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

²Vale do São Francisco University, Petrolina-PE, Brazil

³Institut of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

⁴Institut of Molecular Genetics, Moscow, Russia

⁵Institut of Biophysic, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

*E-mail: rayleneramos@yahoo.com.br

The native goats of Northeastern Brazil are an important genetic resource; however, several breeds are endangered due to the productive system requirements. The use of a native breed, Canindé, in a transgenesis programme is a possibility to get more value to this breed and consequently to aid in its conservation. Thus, the aim of this study was verify the microinjetable embryo production in Canindé goats submitted to standard hormonal protocol. For this, 11 Canindé goats were used as embryo donors. The goats were estrus-synchronized using intravaginal sponges containing 60 mg MAP (Progespon, Buenos Aires, Argentina) for 10 days with an intra-muscular (i.m.) injection of 50 µg d-cloprostenol (Ciosin, São Paulo, Brazil) on the eighth day of progestagen treatment. The superovulation was obtained using 120 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Ontario, Canada) given twice daily in i.m. decreasing doses over three days starting 48 h prior to sponge removal. Thirty-six hours after sponge removal, donors received 100 µg GnRH (Fertagyl, Boxmeer, Netherlands) i.m. and were hand bred by fertile Canindé bucks at 36 and 48 h after sponge removal. Responsive donors to superovulatory regime (at least with five ovulations) were submitted to embryo recovery by laparotomy. The structures were recovered by oviductal collect 72 h after mating and were evaluated under stereomicroscope. The zygotes were selected and centrifuged at 13.400 rpm for four to six minutes to visualize the pronuclei and to perform the microinjection with a DNA construction consisting of the goat α S1-casein promoter linked to the sequence encoding hG-CSF (6431 bp). The pronuclear microinjection was performed using an inverted microscope (TE-2000U, Kawasaki, Japan) with Nomarski optics and micromanipulators (Narishige, Tokyo, Japan). The quality of microinjection was evaluated subjectively as good, regular and poor, according to the pronuclei visualization and facility to microinject. Only one goat treated for estrus synchronization and superovulation did not response to hormonal protocol. The overall mean ovulation rate was 11.8 ± 2.1 . Altogether 109 oocytes/embryos were recovered. The overall recovery rate was 85.2% (9.9 ± 1.8 structures per goat). The fertilization rate was 89.9% (98/109) and 80.6% (79/98) of them were at the one-cell stage, i.e., at optimum time for microinjection. In the total 61 zygotes were microinjected and 96.7% of them were classified as good. Our results showed that the standard protocol was efficient to produce pronuclear zygotes in Canindé goats to posterior DNA microinjection. Thus, the conservation of Canindé goats can be favored by the use of the same one in transgenesis programme.

Acknowledgments: This study was supported by a grant from MCT-FINEP (Brazil). The authors would like to thanks the LFCR staff for animal care.

ANEXO II

RESUMO PUBLICADO: Caprinos transgênicos Canindé e Saanen obtidos por microinjeção pró-nuclear da construção com o gene do fator estimulante de colônias de granulócitos humano (hG-CSF).

XXII Reunião Anual da SBTE
Sociedade Brasileira de Tecnologia de embriões, Guarujá/SP
21 a 24 de agosto/2008

CAPRINOS TRANSGÊNICOS CANINDÉ E SAANEN OBTIDOS POR MICROINJEÇÃO PRÓ-NUCLEAR DA CONSTRUÇÃO COM O GENE DO FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS HUMANO (hG-CSF)

Moura, R.R.¹; Almeida, K.C.¹; Pereira, A.F.¹; Sousa, F.C.¹; Cruz, S.A.¹; Guimarães, C.R.¹; Silva, S.T.C.¹; Melo, C.H.S.¹; Benevides, F.J.T.¹; Melo, L.M.¹; Teixeira, D.I.A.¹; Lopes Júnior, E.S.²; Serova, I.A.³; Andreeva, L.E.⁴; Dvoryanchikov, G.A.⁵; Dias, L.P.B.⁶; Carvalho, A.C.C.⁶; Serov, O.L.³; Freitas, V.J.F.¹

¹Universidade Estadual do Ceará, 60740-930, Fortaleza-CE, Brasil, ²Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56308-190 Petrolina-PE, Brasil, ³Instituto de Citologia e Genética, 630090, Novosibirsk, Rússia, ⁴Instituto de Genética Molecular, 123182, Moscou, Rússia, ⁵Universidade de Miami, 33124, Miami-Flórida, EUA, ⁶Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, rayleneramos@yahoo.com.br

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de embriões pró-nucleares (PN), viabilidade de embriões após microinjeção de DNA e a eficiência total da produção de caprinos transgênicos. Para tanto, cabras das raças Canindé (n = 12) e Saanen (n = 12) foram utilizadas, como doadoras e 52 fêmeas sem padrão racial definido, como receptoras. Todas as fêmeas foram submetidas a sincronização de estro por esponjas vaginais (60 mg de MAP, Progespon, Buenos Aires, Argentina) por 10 dias e uma injeção i.m. de 50 µg de d-cloprostenol (Ciosin, São Paulo, Brasil) no oitavo dia. Neste momento, foi iniciada a superovulação com injeções i.m. de 200 mg (Saanen) ou 120 mg (Canindé) de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Ontario, Canadá), intervaladas de 12 h por três dias. As receptoras receberam uma injeção i.m. de 300 UI de eCG (Novormon, Buenos Aires, Argentina) no oitavo dia do tratamento progestágeno. As doadoras também receberam 100 µg de GnRH (Fertagyl, Boxmeer, Holanda), por via i.m., 36 h após o final do tratamento progestágeno e foram cobertas por monta natural às 36 e 48 h após retirada da esponja. As estruturas foram recuperadas por colheita ovidutária 72 h após o término do tratamento progestágeno. Os presumíveis embriões foram colhidos por lavagem ovidutária 72 h após o final do tratamento progestágeno. Os embriões PN colhidos foram centrifugados para posterior microinjeção com uma construção de DNA, a qual consistiu do promotor para α S1-caseína caprina ligado à seqüência que codifica o hG-CSF (6431 pb). A qualidade da microinjeção foi avaliada subjetivamente como excelente, regular ou ruim de acordo com a visualização e facilidade de microinjeção. Cada receptora recebeu de dois a cinco embriões por transferência ovidutária e o diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia aos 30 dias pós-transferência. O DNA foi extraído da orelha dos cabritos de uma semana de idade e a identificação dos animais transgênicos foi realizada por PCR. Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio. A taxa de ovulação foi estatisticamente superior nas doadoras Saanen (24,5 ± 11,7) em comparação àquelas da raça Canindé (11,8 ± 7,0). Verificou-se uma menor (P<0,05) porcentagem de estruturas fecundadas na raça Saanen (36,2%) em comparação à Canindé (89,9%). As doadoras Canindé também produziram um maior percentual (P<0,05) de embriões pró-nucleares (80,6% vs 56,9%). A microinjeção foi considerada excelente em 96,7% e 73,3% nos embriões Canindé e Saanen, respectivamente (P<0,05). Trinta e duas receptoras foram inovuladas. A taxa de gestação e de fertilidade ao parto foi de 59,4% (19/32) e de 46,9% (15/32), respectivamente. Foram identificados três cabritos transgênicos, sendo dois da raça Canindé e um da raça Saanen, representando 13,0% (3/23) dos cabritos nascidos e 3,3% (3/91) dos embriões microinjetados/transferidos. Desta forma, caprinos da raça Canindé foram mais eficientes tanto na produção de embriões PN quanto na obtenção de crias transgênicas. Neste sentido, a raça Canindé pode ser utilizada como um bom modelo para programas de transgênese em caprinos.

CANINDÉ AND SAANEN TRANSGENIC GOATS OBTAINED BY PRONUCLEAR MICROINJECTION OF HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (hG-CSF) GENE CONSTRUCT

The aim of this study was to verify the production of pronuclear embryos (PN), embryo viability after DNA microinjection and the overall efficiency of the production of transgenic goats. For this, Canindé (n=12) and Saanen (n=12) goats were used as donors and 52 undefined breed goats as recipients. All females were submitted to estrus synchronization treatment using vaginal sponges (60 mg of MAP, Progespon, Buenos Aires, Argentina) for 10 days with an i.m. injection of 50 µg d-cloprostenol (Ciosin, São Paulo, Brazil) on the eighth day. In this moment, the superovulation was started with i.m. injections of 200 mg (Saanen) or 120 mg (Canindé) of NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Ontario, Canada), at 12 h interval over three days. Recipients received i.m. injection of 300 IU of eCG (Novormon, Buenos Aires, Argentina) on the eighth day of progestagen treatment. Donors also received 100 µg GnRH, (Fertagyl, Boxmeer, Holland), by i.m. injection, 36 h after to the end progestagen treatment and they were hand bred at 36 and 48 h after sponge removal. The presumable embryos were recovered by oviductal flushing 72 h after the end of progestagen treatment. The recovered PN embryos were centrifuged to posterior microinjection with a DNA construction consisting of the goat α S1-casein promoter linked to the sequence encoding hG-CSF (6431 bp). The quality of microinjection was evaluated subjectively as excellent, regular and poor, according to visualization and facility of microinjection. Each recipient received two to five embryos by oviductal transfer and pregnancy was diagnosed by ultrasonography performed 30 days after embryo transfer. DNA was extracted from the ears of one-week-old kids and the identification of transgenic animals was carried out by PCR amplification. The PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The ovulation rate was statistically higher in Saanen donors (24.5 ± 11.7) when compared to those of Canindé breed (11.8 ± 7.0). It was verified a lower ($P < 0.05$) percentage of the fertilized structures in Saanen breed (36.2%) in comparison to Canindé (89.9%). The Canindé donors also produced a higher percentage ($P < 0.05$) of PN embryos (80.6% vs 56.9%). The microinjection was considered as excellent in 96.7% and 73.3% in Canindé and Saanen embryos, respectively ($P < 0.05$). Thirty and two recipients received the microinjected embryos. The pregnancy and fertility rate at kidding was 59.4% (19/32) and 46.9% (15/32), respectively. It was identified three transgenic goats, two Canindé and one Saanen kid, representing 13.0% (3/23) of the kids born and 3.3% (3/91) of the microinjected/transferred embryos. Thus, Canindé goats were more efficient to produce PN embryos as to obtain transgenic kids. This way, Canindé breed can be used as a good model in goat transgenesis programme.

ANEXO III

RESUMO PUBLICADO: Avaliação da produção de embriões pró-nucleares em cabras das raças Saanen e Canindé visando a microinjeção de DNA em um programa de transgênese.

Universidade Estadual do Ceará – UECE
Anais da XIII Semana Universitária
20- 24 de outubro/2008

Avaliação da produção de embriões pró-nucleares em cabras das raças Saanen e Canindé visando a microinjeção de DNA em um programa de transgênese.

Moura, R.R., Lopes-Junior, E.S., Serova, I.A., Andreeva, L.E., Freitas, V.J.F.

Caprinos transgênicos frequentemente são produzidos por microinjeção pró-nuclear de embriões produzidos *in vivo*. Uma etapa fundamental é a produção de embriões pró-nucleares para o sucesso de um programa de transgênese. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar em duas raças caprinas a produção quanti-qualitativa de embriões pró-nucleares a serem utilizados para microinjeção de DNA. Para tanto, foram utilizadas como doadoras de embriões cabras das raças Saanen (n = 12) e Canindé (n = 12), as quais receberam um tratamento hormonal de sincronização de estro consistindo de esponjas vaginais (60 mg de MAP, Progespon, Argentina) por 10 dias e uma injeção i.m. de 50 µg de d-cloprostenol (Ciosin, São Paulo, Brasil) no oitavo dia. Neste momento, foi iniciado a superovulação com injeção i.m. de 200 mg (Saanen) ou 120 mg (Canindé) de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Ontario, Canadá), intervaladas de 12 h por três dias. Trinta e seis horas após a retirada da esponja, as fêmeas receberam 100 µg de GnRH (Fertagyl, Boxmeer, Holanda). A fecundação ocorreu por monta natural às 36 e 48 h após o final do tratamento progestágeno. As estruturas foram recuperadas por colheita ovidutária às 72 h após a retirada da esponja. Os embriões pró-nucleares colhidos foram centrifugados para posterior microinjeção com uma construção de DNA, a qual consistiu do promotor para α s1-caseína caprina ligado à seqüência que codifica o hG-CSF (6431 pb). Um pequeno aumento do pró-núcleo foi o critério indicador de uma microinjeção bem sucedida. A qualidade da microinjeção foi avaliada subjetivamente como excelente, regular ou ruim de acordo com a visualização e facilidade de microinjeção. Além disso, foram mensurados o diâmetro total, espessura da zona pelúcida, diâmetro do citoplasma e diâmetro dos pró-núcleos. Parâmetros relacionados ao estro, taxa de ovulação, número de estruturas recuperadas e dados referentes às mensurações dos embriões foram analisados pelo teste *t* de Student não pareado. Dados expressos em porcentual foram avaliados pelo teste do qui-quadrado ou teste de Fischer quando conveniente. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Foi verificado que as cabras Saanen apresentaram-se mais precocemente ($P < 0,05$) em estro que as Canindé: $17,7 \pm 5,2$ h vs $26,8 \pm 7,6$ h. A taxa de ovulação foi estatisticamente superior ($P < 0,05$) na raça Saanen ($24,5 \pm 11,7$) em comparação à raça Canindé ($11,8 \pm 7,0$). Após a colheita ovidutária, foi verificada uma menor porcentagem ($P < 0,05$) de estruturas fecundadas na raça Saanen (36,2%) em relação à raça Canindé (89,9%). A raça Canindé também produziu um maior porcentual ($P < 0,05$) de embriões pró-nucleares: 80,6% vs 56,9%. A microinjeção de DNA foi considerada excelente em 96,7% e 73,3% nos embriões Canindé e Saanen, respectivamente ($P < 0,05$). Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas para todos os parâmetros embrionários mensurados, com exceção dos valores do diâmetro do citoplasma. Desta forma, cabras doadoras da raça Canindé foram mais eficientes que aquelas da raça Saanen quanto à produção quanti-qualitativa de embriões pró-nucleares. Em adição, a conservação de caprinos da raça Canindé pode ser favorecida pelo seu uso em programas de transgênese.

ANEXO IV

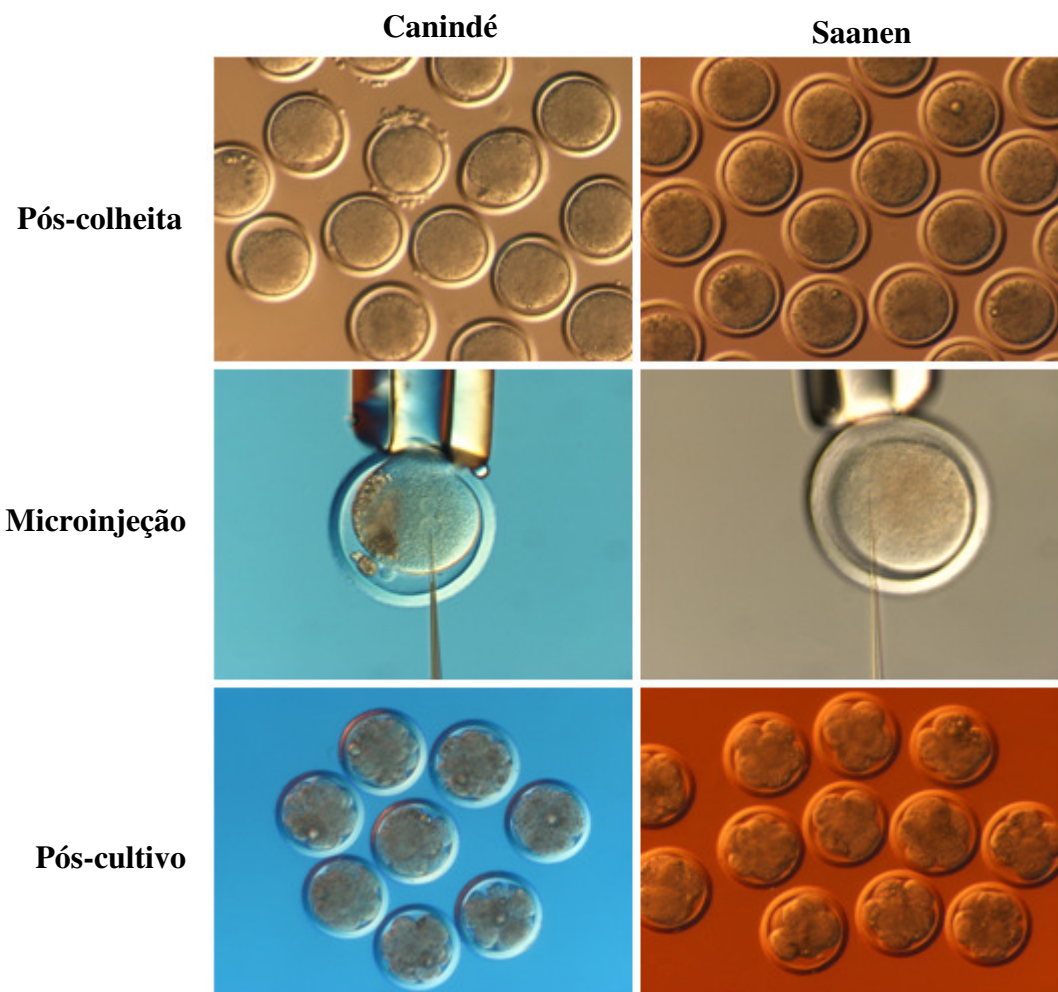


Figura 1 – Oócitos e embriões caprinos das raças Canindé e Saanen utilizados em um programa de transgênese.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)