

## APLICAÇÃO DAS BIOTÉCNICAS DE MOIFOPA, TRANSGÊNESE E CLONAGEM NA REPRODUÇÃO DE CAPRINOS.

*[Accomplishment of the biotechniques MOIFOPA, transgenesis and clonage in caprine reproduction]*

**Gabriela Liberalino Lima, Érika Aparecida Araújo dos Santos\***

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN.

**RESUMO** - A pecuária corresponde hoje a mais da metade da produção agrícola em países desenvolvidos e mais de um quarto em países em desenvolvimento. Os caprinos têm grande importância econômica pela sua contribuição na produção de carne, leite e pele em diversos países. Este crescimento tem requerido novos conhecimentos técnicos e científicos, especialmente relacionados ao aumento da eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos, o que levou ao desenvolvimento de várias biotécnicas ligadas a reprodução. Estas biotecnologias têm um papel direto na obtenção de maior número de animais de elevada qualidade. Entretanto algumas delas ainda não possuem aplicabilidade direta, permanecendo restritas aos centros de pesquisa, tais como a transgênese, clonagem e MOIFOPA. No futuro poderão ter aplicações na produção de produtos farmacológicos, na produção de modelos para estudos de doenças animais ou humanas, na melhoria de características de produção animais, no estudo da regulação e a expressão gênica, entre muitas outras, estando direta ou indiretamente relacionadas ao bem-estar do homem. Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma breve revisão sobre algumas biotécnicas aplicadas à reprodução da espécie caprina.

**Palavras- Chave:** eficiência reprodutiva, biotecnologia, reprodução assistida.

**ABSTRACT** - The animal business corresponds to more than a half of the agricultural production in developed countries and to more than a quart in developing ones. Goats have a huge economic importance because of its contribution on meat, milk and skin production in many countries. This growth requires new technical and scientific acknowledgments, especially those related to improvement of productive and reproductive efficiency of cattles, that lead the development of some biotechniques related to reproduction. These biotechnologies have a directly role on the gain of a larger number of animals with high quality. However some of them still don't have directly application, they are still restricted at research centers such as transgenesis, clone and MOIFOPA. On the future it could contributes for medicine production, for models to animals and human disease studies, on the study of genetics regulation and expression, being directly or indirectly related to human well being. On this way, the objective of the present work was to perform a brief review of some biotechniques applied to goat reproduction.

**Keywords:** reproductive efficiency, biotechnology, assisted reproduction.

### INTRODUÇÃO

A pecuária corresponde hoje a mais da metade da produção agrícola em países desenvolvidos e mais de um quarto em países em desenvolvimento. Os caprinos são uma espécie de elevada importância econômica pela sua contribuição na produção de carne, leite e pele em diversos países (Paula et al., 2008). O aumento na produção visa não só a expansão do número de animais, mas,

principalmente, o aumento de sua eficiência (Milazzotto et al., 2008).

Este crescimento tem requerido novos conhecimentos técnicos e científicos, nos quais as instituições públicas e privadas vêm desempenhando um papel de fundamental importância. Avanços tecnológicos dirigidos aos diversos segmentos repercutem no aumento da produção animal, sendo que as biotecnologias reprodutivas têm uma atuação

\* Autor para correspondência. E-mail: erikasantos\_vet@hotmail.com.

direta na obtenção de maior número de animais de elevada qualidade (Paula et al., 2008).

Algumas dessas técnicas aumentam a seleção diferencial, como a inseminação artificial e a transferência de embriões, enquanto outras aceleram o progresso encurtando, o intervalo entre gerações, como a produção in vitro de embriões a partir de animais pré-púberes (Baldassarre e Karatzas, 2004). Estas biotecnologias permitem uma maior produção no número de descendentes daqueles animais de elevado mérito genético do que seria possível pela reprodução natural (Corteel et al., 1988).

Entretanto algumas das biotécnicas ligadas à reprodução ainda permanecem mais restritas a centros de pesquisa como a transgenia, a clonagem e a MOIFOPA (Milazzotto et al., 2008).

O desenvolvimento destas novas técnicas resulta em inúmeras aplicações na biomedicina, na biologia molecular e na agropecuária (Bressan et al., 2008). Tendo perspectivas de aplicações na produção de produtos farmacológicos, na produção de modelos para estudos de doenças animais ou humanas, na melhoria de características de produção animais, no estudo da regulação e a expressão gênica, entre muitas outras, estando direta ou indiretamente relacionadas ao bem-estar do homem (Jaenisch, 1988; Houdebine, 2005).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma breve revisão de literatura sobre as principais biotécnicas ligadas à reprodução da espécie caprina – Transgênese, Clonagem e MOIFOPA.

### MOIFOPA

O folículo é a unidade morfológica e funcional do ovário dos mamíferos, a qual mantém o crescimento e a maturação do oócito (Durrant et al., 1998). É constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais) e desempenha duas funções principais, que são interdependentes: uma endócrina (produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídeos) e a outra exócrina ou gametogênica. Nesta última função, o folículo é um elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária, para assegurar o crescimento e a maturação de oócitos primários ou imaturos e, finalmente, para liberar um oócito maturado no processo de ovulação (Figueiredo et al., 2002).

A população folicular do ovário é bastante heterogênea e localiza-se no córtex ovariano. De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários (Figueiredo et al., 2008). De acordo com o estágio de desenvolvimento os folículos podem ser classificados como primordiais, primários, secundários (Hulshof et al., 1994), terciários e maduros.

Ao nascimento o ovário dos mamíferos é constituído por milhares de folículos primordiais, os quais são considerados o pool de reserva dos folículos ovarianos. Entretanto, mais de 99,9% destes folículos nunca atingem a ovulação, visto que a maioria morre por um processo fisiológico designado atresia folicular (Marström et al., 2002). Evidências morfológicas indicam que existem dois tipos de atresia: A e B. Na atresia do tipo A, as alterações degenerativas ocorrem primariamente no oócito, sendo predominante em folículos pré-antrais. A atresia do tipo B é típica de folículos antrais, na qual as primeiras alterações ocorrem nas células da granulosa (Spanel-Borowski, 1981).

A atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, que pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica (Figueiredo et al., 2008). A isquemia é uma das principais causas do desencadeamento da morte celular por degeneração (Farber, 1982). A progressão da apoptose em folículos ovarianos é dependente de uma regulação cooperativa de diferentes fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, e é possível que nenhum desses fatores, isoladamente, seja essencial para o controle do crescimento folicular ou atresia. É mais provável que o balanço entre os fatores que promovem a sobrevivência e aqueles que induzem a apoptose estabeleça se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (Hsu & Hsueh, 2000).

Considerando a quantidade mínima de folículos que se desenvolve até o estágio de folículo pré ovulatório, tem sido desenvolvida a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré Antrais - MOIFOPA, a qual objetiva recuperar os oócitos inclusos nesses folículos e cultivá-los in vitro até sua completa maturação (Eppig & O'Brien, 1996). Esta biotécnica consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, sua conservação visando a estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período e no cultivo folicular que tem como finalidade promover o crescimento, maturação e

fecundação in vitro dos oócitos previamente inclusos nestes.

A MOIFOPA é uma biotécnica de grande importância tanto para a pesquisa fundamental ou básica, quanto para a reprodução animal. Com relação à pesquisa fundamental, essa biotécnica contribui para a elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese na fase pré-antral. No tocante à reprodução animal, o isolamento de milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário e posterior cultivo in vitro dos oócitos neles inclusos até o estágio de maturação poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. Esse objetivo será alcançado por meio do fornecimento de grande número de oócitos oriundos de um único animal, que seriam crescidos e maturados in vitro e utilizados posteriormente nas biotécnicas de fertilização in vitro e clonagem. O fornecimento de uma população homogênea de oócitos oriundos de um mesmo animal proporcionado pela MOIFOPA contribuirá também para a padronização de técnicas como clonagem, fertilização in vitro e transgenia (Figueiredo et al., 2002).

Ela apresenta ainda inúmeras outras vantagens, como aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico ou perigo de extinção, redução do intervalo entre gerações, recuperação de animais eliminados por problemas sanitários, uso de animais que não respondem a tratamentos de superovulação, obtenção de descendentes de um animal mesmo após sua morte, otimização e padronização de outras biotécnicas como a fertilização in vitro, tecnologia de embriões, clonagem e transgenia (Figueiredo et al., 2008).

No que diz respeito aos estudos em folículos antrais, seu desenvolvimento tem sido amplamente descrito, entretanto as informações acerca da fisiologia dos folículos pré-antrais são escassas. Através da realização de estudos histológicos, sabe-se que os folículos primordiais são ativados e transformam-se, sucessivamente, em folículos intermediários, primários e secundários. Entretanto, não são conhecidos com exatidão os fatores que promovem ou inibem a ativação dos folículos primordiais, bem como aqueles implicados no controle do crescimento de folículos primários e secundários (Figueiredo et al., 2007).

Nesse contexto, a biotécnica de MOIFOPA tem contribuído de forma decisiva para a compreensão destes fatores. Vários estudos com cultivo in vitro de FOPA demonstraram hormônios, fatores de crescimento e peptídeos que estão envolvidos no

controle do desenvolvimento, dentre os quais destacam-se: o hormônio foliculo estimulante (FSH), o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGFs 1 e 2), kit ligand (KL), fator de crescimento epidermal (EGF), proteínas morfogenéticas ósseas 4, 7 e 15 (BMPs 4, 7 e 15), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), ativina e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Martins et al., 2008).

Além da contribuição na pesquisa fundamental esta biotécnica tem grande importância para a produção de embriões em larga escala, uma vez que permite a recuperação de vários folículos a partir de um único ovário, dos quais são isolados oócitos que podem ser destinados para a produção in vitro de embriões (Figueiredo et al., 2007).

Em animais de laboratório os resultados são bastante satisfatórios, nos quais se obteve o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados in vitro (Eppig & O'Brien, 1996). Mais recentemente, esta mesma equipe aperfeiçoando o protocolo utilizado anteriormente, relatou a produção de embriões e o nascimento de 59 camundongos saudáveis a partir de folículos pré-antrais cultivados, maturados e fecundados in vitro (O'Brien et al., 2003).

Nas espécies domésticas Hirao et al. (1994) obtiveram a ovulação in vitro a partir de folículos pré antrais isolados que cresceram e maturaram in vitro. Foi ainda obtido a formação de antro a partir de folículos secundários isolados e cultivados in vitro em bovinos, caprinos e ovinos (Gutierrez et al., 2000; Cecconi et al., 1999; Huamin & Yong, 2000). Em suínos chegou-se até o estágio de blastocisto após cultivo de folículos secundários, maturação e fecundação in vitro (Wu et al., 2001). Em caprinos obteve-se O primeiro embrião "in vitro" obtido a partir de ovário artificial caprino, produzido pelo pesquisador José Ricardo de Figueiredo e sua equipe, na Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará (Favet-Uece) em 2009 (Diário do Nordeste, 2009).

## CLONAGEM

Clonagem é o processo de reprodução assexuada que resulta na obtenção de cópias geneticamente idênticas de um mesmo organismo, seja ele animal ou vegetal. A clonagem animal passou a ser mais conhecida em 1997, quando pesquisadores do Instituto Roslin, da Escócia, anunciaram a clonagem

do primeiro mamífero, a partir de células mamárias de uma ovelha. O nascimento de Dolly, como foi chamada a ovelhinha, marcou o início de uma corrida pelo aperfeiçoamento da técnica que cria expectativas que ainda não podem ser satisfeitas (Bento et al., 2005).

Clones podem atualmente ser produzidos graças à evolução da tecnologia de transferência nuclear ou reconstrução embrionária e por bipartição embrionária (Bento et al., 2005). Esta tecnologia teve uma rápida expansão sendo utilizada em diversos laboratórios para as mais diversas espécies. No entanto, taxa de sucesso na clonagem de animais, é na maioria das vezes não superior a 1% (Solter, 2000). A baixa viabilidade dos embriões clonados é principalmente expressa pela redução na taxa de implantação, pelo aumento na taxa de mortalidade fetal e perinatal, e pelas diversas anomalias observadas nos animais nascidos. Em contraste com as diversas espécies clonadas, na espécie caprina não foram observados problemas relacionados com placentação, peso ao nascer, distúrbios cardíaco-respiratórios, nem de mortalidade peri-natal, o que faz dessa espécie um ótimo modelo para a produção de animais transgênicos assim como para tentarmos entender o mecanismo destas síndromes nas demais espécies clonadas (Bordignon, 2003).

A clonagem de animais representa um grande avanço tecnológico, mas ainda é uma técnica em experimento que necessita de aperfeiçoamento para que possa realmente ser difundida no meio agropecuário e social. A alta taxa de mortalidade em experimentos com animais causa alarme e torna essa técnica cercada de muitas polêmicas. As possíveis formas de clonar animais e seus reflexos nestes experimentos, assim como seus resultados, abrem ampla margem para discussão sobre o assunto (Bento et al., 2005).

### TRANSGÊNESE

O termo transgenia é definido como a introdução, alteração ou inativação de uma sequência gênica no genoma de organismos pluricelulares, sendo estas mudanças capazes de serem transmitidas à progênie da espécie manipulada (Rulicke et al., 2007). A geração de transgênicos visa à obtenção de organismos com características novas ou melhoradas relativamente ao organismo original (Freitas, 2002).

Em relação à transgenia em animais o camundongo pode ser considerado o grande marco, com os primeiros a serem modificados geneticamente em

meados da década de 70 (Jaenisch et al., 1975). Até hoje os camundongos são os principais modelos de estudo genético em mamíferos, sendo que seu genoma já se encontra inteiramente seqüenciado (Waterston et al., 2002). A partir dos avanços com camundongos foram surgindo relatos sobre modificações genéticas em animais de produção como bovinos, suínos, ovinos e caprinos (Rumpf & Melo, 2005).

Na década de 80, foram demonstradas as primeiras tentativas de geração de animais transgênicos, incluindo camundongos, ovelhas, coelhos e porcos com potencial de expressão protéica exógena (Gordon et al., 1980; Gordon & Ruddle, 1981; Hammer et al., 1985; Palmiter et al., 1982). Desde então, a produção de diversas proteínas recombinantes de interesse farmacêutico tem sido descrita em animais transgênicos gerados por ferramentas da biologia molecular em conjunto com biotécnicas reprodutivas avançadas (Collares et al., 2007).

A transgênese inclui fundamentalmente dois diferentes tipos de experimento: adição de genes e troca de genes por recombinação homóloga. No primeiro caso uma informação genética adicional é introduzida de uma maneira estável dentro do genoma do animal. O gene “estranho” geralmente codificam para uma proteína a qual pertence à mesma espécie ou outra espécie animal. O gene adicional pode ter sido transferido para inibir a expressão de um gene endógeno. No segundo caso, o DNA “estranho” pode ser um gene inativo. O gene endógeno assim torna-se eliminado (knocked out). O DNA “estranho” pode ser modificado mas a versão ativa do gene endógeno ou um gene bastante diferente (Freitas et al., 2007a).

As aplicações, como a produção de produtos farmacológicos, a produção de modelos para estudos de doenças animais ou humanas, a melhoria de características de produção animal, o estudo da regulação e a expressão gênica, entre muitas outras, são direta ou indiretamente relacionadas ao bem-estar do homem (Jaenisch, 1988; Houdebine, 2005).

Embora muitas proteínas terapêuticas humanas sejam, atualmente, produzidas em fermentadores microbiológicos, usando técnicas de DNA recombinante, o processamento microbiano não se mostra adequado para um grande número de proteínas bioativas, isso porque as bactérias não são capazes de realizar reações de modificações pós-sintéticas, as quais são requeridas para a atividade biológica plena (Collares et al., 2007).

O cultivo de células de mamíferos foi uma alternativa interessante para resolver os problemas dos padrões diferenciados na execução das modificações pós-traducionais. Entretanto, quando esse sistema é transportado a propósitos de produção em larga escala, torna o custo extremamente alto, inviabilizando a produção de proteínas recombinantes neste sistema (Niemann et al., 2005).

Uma alternativa em potencial, apesar de ainda ter de cruzar muitas barreiras reguladoras é a produção de animais transgênicos como modelos de biorreatores de proteínas com elevado valor biológico. Este processo possui um elevado custo, mas a relação custo - benefício mostra-se favorável, uma vez que após o animal ser produzido, pode reproduzir-se e propagar o gene de interesse a sua progênie (Wall et al., 2000).

A possibilidade de animais transgênicos expressarem proteínas em determinados órgãos, utilizando-se promotores tecido-específicos, torna-os viáveis como biorreatores de proteínas de importância biomédica. Animais de produção podem servir como biofábricas na produção em larga escala de proteínas expressas nos fluidos corporais. O isolamento de proteínas expressas nos fluidos corporais apresenta vantagens sobre os tecidos, pois estes são constantemente produzidos e aquelas são facilmente recuperadas, quando comparado aos tecidos (Wheeler et al., 2003). Isto tem sido relatado para uma série de proteínas, sejam em vacas, cabras, ovelhas, porcas, coelhas ou camundongas (Houdebine, 2002).

A produção de proteínas terapêuticas de animais biorreatores é bem estabelecida e os primeiros produtos já estão na fase final de aprovação e prestes a ganhar o mercado (Hunter et al., 2005; Collares et al., 2007). Uma grande variedade de proteínas humanas, totalizando um número aproximado de 100, tem sido expressa no leite de diversas espécies animais, como bovinos, caprinos, ovinos, suínos e coelhos transgênicos (Dunn et al., 2005; Soler et al., 2006).

Em 2006 foi aprovada pela Agência Européia de Medicina a produção pioneira da antitrombina humana pela empresa americana GTC Biotherapeutics, valendo-se de cabras transgênicas como biorreatores. O novo medicamento se chama Atryn® e será comercializado na Grã-Bretanha e em outros países europeus (Freitas et al., 2007b).

Em 2000 foi iniciado um projeto entre a Universidade Estadual do Ceará (UECE), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Academia de Ciências da Rússia para produção de caprinos transgênicos como biorreatores. A idéia geral deste projeto está baseada na possibilidade de introduzir no genoma de caprinos uma construção de DNA capaz de promover a produção de qualquer proteína humana de valor terapêutico pela glândula mamaria dessa espécie. Em um primeiro passo foi planejado obter caprinos transgênicos capazes de produzir o “Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano” (hG-CSF). Essa proteína foi escolhida devido à sua importância para saúde humana, pois o hG-CSF aplica-se extensivamente na prevenção do desenvolvimento da neutropenia, após químico ou radioterapias intensivas, na estimulação da hematopoiese após transplante de medula óssea ou ainda no tratamento de diversas doenças relacionadas à imunodeficiência. O hG-CSF também vem sendo utilizado como um fator que mobiliza células tronco para regeneração das áreas de infarto no miocárdio, mostrando um novo e amplo campo de aplicação desse fármaco (Freitas et al., 2007b).

Em 2006 foi realizado um experimento pela referente equipe, na qual os embriões foram microinjetados com uma construção de DNA, contendo o gene do hG-CSF. Após a microinjeção, os embriões foram transferidos para as receptoras que responderam ao tratamento, obtendo um macho transgênico, chamado de “Carlos” sendo o primeiro relato do nascimento de um caprino transgênico na América Latina (Freitas et al., 2007b).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços obtidos com relação às biotécnicas ligadas à reprodução animal têm acompanhado o crescimento da caprinocultura mundial. Estas técnicas apresentam grande importância uma vez que assumem o papel de ferramenta essencial para o melhoramento genético dos rebanhos. Apesar de algumas destas ainda estarem restritas aos centros de pesquisa, como é o caso da MOIFOPA, transgênesis e clonagem, despontam como promissoras na medicina veterinária e humana, contribuindo para a elucidação de vários mecanismos envolvidos na reprodução e em doenças, bem como na produção de fármacos e substâncias de importância na biologia. Sendo ainda necessárias mais pesquisas para que seja possível a sua aplicabilidade.

## REFERÊNCIAS

- Baldassarre H. & Karatzas C.N. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* 82/83:255-266.
- Bento M.A.F., Silva V.A.P. & Alvim N.C. 2005. Clonagem de Animais. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. n. 4.
- Bordignon V. 2003. Clonagem de animais por transferência nuclear: avanços e desafios. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, 17, 2003, Beberibe, CE. *Anais... Beberibe, CE: SBTE*. p.64-74.
- Bressan F.F., Miranda M.S., De Bem T.H.C., Pereira F.T.V., Binelli M., Meirelles F.V. 2008. Produção de animais transgênicos por transferência nuclear como modelo de estudo biológico. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte* 32(4):240-250.
- Cecconi S., Barboni B., Coccia M., Mattioli M. 1999. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, 60:594-601.
- Collares T., Seixas F.K., Campos V. F., Cavalcanti P.V., Deschamps J.C. 2007. Animais transgênicos biorreatores. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte* 31(4):462-478.
- Corteel J.M., Leboeuf B., Baril G. 1988. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rum Res* 1:19-35.
- Dunn D.A., Kooyman D.L., Pinkert C.A. 2005. Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. *Drug Disc Today* 10:757-767.
- Durrant B.S., Pratt N.C., Russ K.D., Bolamba D. 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 49:917-32.
- Eppig J.J., O'Brien M.J. 1996. Development in vitro of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biol Reprod* 54:197-207.
- Farber J.L. 1982. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab. Invest* 47:114-123.
- Figueiredo J.R., Gonçalves P.B.D., Freitas V.J.F. 2008. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2 ed. Roca, São Paulo, p.408.
- Figueiredo J.R., Celestino J.J.H., Rodrigues A.P.R., Silva J.R.V. 2007. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte* 31(2):143-152.
- Figueiredo J.R., Gonçalves, P.B.D., Freitas, V.J.F. 2002. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2ª edição. Varela, São Paulo, p.340.
- Freitas V.J.F., Serova I.A., Andriiva L.I., Serov O. 2007a. Estado da arte na produção de caprinos transgênicos clonados. *Acta Scientiae Veterinariae* 35:899-904.
- Freitas V.J.F., Serova, I. A., Andriiva L.I., Dvoriantchikov G., Lopes Junior E.S., Teixeira D.I.A., Moura R.R., Melo L.M., Pereira A.F., Carvalho A.C.C., Serov O. 2007b. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79:585-592.
- Freitas V.J.F., Serova I.A., Andreeva L.E. et al. 2002. Embryo recovery and transfer in a transgenic goat program in Brazil. *Theriogenology* 57:780.
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7380-7384.
- Gordon J.W., Ruddle F.H. 1981. Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected Into Mouse Pronuclei. *Science* 214:1244-1246.
- Gutierrez C.G., Ralph J.H., Telfer E.E., Wilmut I., Webb R. 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. *Biol Reprod*, 62:1322-1328.
- Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., Brinster R.L. 1985. Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection. *Nature* 315:680-683.
- Hirao Y., Nagai T., Kubo M., Miyano T., Miyake M., Sato S. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil* 100:333-339.
- Houdebine L.M. 2005. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. *Reprod Domest Anim* 40:269-281.
- Houdebine L.M. 2002. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol* 98:145-160.
- Hsu S.Y., Hsueh A.J. 2000. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis, p. An ovarian paradigm. *Physiol Rev* 80:593-614.
- Huanmin Z., Yong Z. 2000. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology* 54:641-650.
- Hulshof S.C.J., Figueiredo J.R., Beckers J.F. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly* 16:78-80.
- Hunter C.V., Tiley L.S., Sang H.M. 2005. Developments in transgenic technology: applications for medicine. *Trends Mol Med* 11:293-298.
- Jaenisch R. 1988. Transgenic animals. *Science* 240:1468-1474.
- Jaenisch R., Fan H., Croker B. 1975. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington 72(10):4008-4012.
- Markstrom E., Svensson E., Shao R. et al. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123:23-30.
- Martins F.S., Silva J.R.V., Rodrigues A.P.R., Figueiredo J.R. 2008. Fatores Reguladores da Foliculogênese em Mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte* 32(1):36-49.
- Milazzotto M.P., Visintin J.A., Assumpção M.E.O. 2008. A Biologia molecular aplicada à biotecnologia. *Ciênc. Vet. Tróp* 11(1):145-148.
- Niemann H., Kues W.A., Carnwath J.W. 2005. Transgenic farm animals: present and future. *Rev Sci Tech OIE* 24:285-298.
- O'Brien M.J., Pendola J.K., Eppig J.J. 2003. A revised protocol for in vitro development of mouse oocyte from primordial

follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod* 68:1682-1686.

Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Birnberg N.C., Evans R.M. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* .300:611-615.

Paula N.R., Cardoso J.F.S., Oliveira M.A.L., Freitas V.J.F. 2008. Embriões caprinos produzidos in vitro ou in vivo: técnicas, problemas e perspectivas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte 32(1):21-35.

Rulicke T., Montagutelli X., Pintado B., Thon R., Hedrich H.J. 2007. Felasa guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents. *Lab Anim* 41:301-311.

Rumpf R. 2005. Produção de animais transgênicos: metodologias e aplicações / Rodolfo RUMPF, Eduardo O. MELO. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 27 p. - (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 0102 – 0110; 145).

Soler E., Thépot D., Gervier S.R., Joliv-Et G., Houdebine L.M. 2006. Preparation of recombinant proteins in milk to improve human and animal health. *Reprod Nutr Dev* 46:579-588.

Solter D. 2000. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet* 1:199-207.

Spanel-Borowski K. 1981. Morphological investigations on follicular atresia in canine ovaries. *Cell. Tiss. Res.* 214:158-168.

Wall R.J., Paleyanda R.K., Foster J.A., Powell A, Rexroad C., Lubon H. 2000. DNA preparation method can influence outcome of transgenic animal experiments. *Anim Biotechnol* 11:19-32.

Wheeler M.B., Walters E.M., Clark S.G. 2003. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. *Anim Reprod Sci* 79:265-289.

Wu J., Benjamin R. E., Carrell D. T. 2001. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod* 64:375-381.

Diário do Nordeste. 2009. Ovário artificial de caprino produz 1º embrião in vitro Capturado em 21 de Fevereiro de 2010. Disponível em <http://diariodonordeste.globo.com>.