



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
ALEXSANDRA FERNANDES PEREIRA

TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS)
EM RUMINANTES: ASPECTOS MOLECULARES E PRODUÇÃO
DE EMBRIÕES

FORTALEZA – CEARÁ

2010

ALEXSANDRA FERNANDES PEREIRA

**TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS) EM
RUMINANTES: ASPECTOS MOLECULARES E PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES**

Tese 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 Doutor 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

2010

P436t Pereira, Alessandra Fernandes
Transferência nuclear de células somáticas (TNCS) em ruminantes: aspectos moleculares e produção de embriões/ Alessandra Fernandes Pereira. — Fortaleza, 2010.
148 p. il
Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas.
Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.
1. Ruminantes. 2. TNCS. 3. Embrião. 4. Oócito. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.089

ALEXSANDRA FERNANDES PEREIRA

**TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS) EM
RUMINANTES: ASPECTOS MOLECULARES E PRODUÇÃO DE
EMBRIÕES**

Tese 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 Doutor em Ciências
Veterinárias.

Defesa em: 13/12/2010.

Conceito obtido: Satisfatório

Nota obtida: 10,0

Banca Examinadora:

Vicente José de Figueirêdo Freitas, Prof. Dr.

Examinador-UECE / Orientador

José Luiz Rigo Rodrigues, Prof. Dr.

Examinador-UFRGS / Co-orientador

Daniel Felipe Salamone, Prof. Dr.

Examinador-UBA / Co-orientador

Marcelo Bertolini, Prof. Dr.

Examinador-UNIFOR

Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Prof. Dr.

Examinador-EMBRAPA Gado de Leite

Dárcio Ítalo Alves Teixeira, Prof. Dr.

Examinador-UECE / Suplente

*“Aos que crêem que investigação científica
é muito mais que um simples trabalho de bancada,
mas quase uma paixão sem medida,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) através da Faculdade de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) por permitir a realização deste curso de doutorado e pelas oportunidades recebidas.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão de bolsa de doutorado no país, sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado-sanduíche no Exterior, possibilitando adquirir uma experiência profissional e pessoal inigualável.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) pela acolhida, ensinando-me a ser uma aluna de pós-graduação. Obrigada pelas inúmeras oportunidades geradas e conhecimentos adquiridos.

A Deus pelo desafio chamado vida, pelo existir, ser, estar e todos os verbos em sua plenitude.

Aos meus pais, Francisco Alves Pereira e Maria Lúcia Fernandes Pereira, pelos exemplos de força, coragem, determinação, persistência e amor incondicional. Ambos representam meus maiores ícones de pessoas honestas e íntegras. Muito obrigada por nunca terem desistido e por me apoiarem em todas as minhas decisões, nunca cobrando minhas inúmeras ausências.

Aos meus irmãos, Francisco Alexandre Fernandes Pereira e Ana Lúcia Fernandes Pereira, e minha cunhada, Aliny Vidal da Silva, por serem meus maiores orgulhos de pessoas fortes e dispostas a transformar o meio em que vivem. Vocês me ensinaram que o impossível não existe!

Ao meu orientador e amigo professor Vicente José de Figueirêdo Freitas pelas inúmeras oportunidades e pelos conhecimentos obtidos ao longo desses seis anos em seu laboratório. Agradeço a amizade, o respeito, os conselhos e a confiança depositada, permitindo participar ativamente da sua equipe de trabalho. Além disso, agradeço aos inúmeros ensinamentos sobre coragem, prudência, paciência, humildade, ética, caráter, responsabilidade e competência. Obrigada pelos momentos alegres gerados pelas suas histórias de bom-humor. Muito obrigada!

À amiga Luciana Magalhães Melo, pela dedicação, apoio, carinho e disponibilidade de tempo para ajudar nos momentos mais necessários. Pessoa pela qual tenho sincera admiração pelo caráter e conquistas profissionais. Muito obrigada por enriquecer meu aprendizado com

sugestões e conselhos pertinentes durante toda essa caminhada, sendo membro essencial para a realização deste trabalho. Uma grande incentivadora da pesquisa e um exemplo de investigadora e estimada amiga. Muito obrigada pelas palavras nos momentos mais necessários.

Ao amigo professor Marcelo Bertolini, ou simplesmente, prof. Bertol., por ter me iniciado nos primeiros passos na clonagem animal. Agradeço pelos momentos de aprendizado, sugestões, amizade sincera, conselhos e palavras sempre muito necessárias. Aprendi que subindo na árvore podemos ver uma floresta muito maior que imaginávamos. Somente erra quem tenta! Muito obrigada pelas contribuições em etapa deste trabalho e por ter me mostrado ensinamentos sempre muito importantes.

Ao professor Daniel Felipe Salamone pela grande oportunidade de proporcionar o aprendizado em micromanipulação embrionária e clonagem em seu laboratório, cultivando sempre as boas palavras de incentivo, força e experiência. Muito obrigada pela acolhida, amizade e por ter me considerado como mais um de seus estudantes de doutorado e membro de sua equipe. “Muchas gracias por todo!”

Ao professor Jose Luiz Rigo Rodrigues pela oportunidade de estágio em seu laboratório, pelas demais oportunidades geradas e aprendizado da experiência de quem tem muito a ensinar.

Ao professor Luiz Sérgio de Almeida Camargo pela simplicidade, amizade, futuras parcerias a serem geradas e disposição em contribuir no engrandecimento desse trabalho.

Aos “amigos irmãos” que ganhei ao longo desses seis anos, Karlliely de Castro Almeida, Dárcio Ítalo Alves Teixeira e Elizabeth Saraiva Peixoto Pinheiro: meus maiores tesouros de amizade. Muito obrigada pelo apoio sempre presente, pela amizade sincera, por nunca medirem esforços para me ajudar e o convívio harmonioso em todos os momentos. Vocês representam parte integrante da minha família: amo vocês! Amigos para sempre, mesmo que o para sempre não exista.

Aos “amigos conquistados”, Francisco Carlos de Sousa, Daniel Holanda Soares e Suely Renata Gaya Avelar, pelo carinho diário, as palavras de ânimo e força sempre surgidas nas ocasiões mais necessárias. Obrigada pelo abraço sempre muito sincero. Jamais vou esquecer todos os momentos de risos, mesmo quando tudo podia aparentar estar triste.

As “amigas de infância” Érica Souza Albuquerque e Maria Cláudia dos Santos Luciano pelo constante carinho, amizade sincera e companheirismo. Muito obrigada pela eterna preocupação, torcida pelo meu sucesso e por sempre estarem dispostas a me ajudar nas atividades. Agradeço o respeito e a confiança depositada a mim como estudante de pós-graduação.

Aos meninos “new generation”, Carlos Henrique Souza de Melo, Antônio Carlos de Albuquerque Teles Filho e Talles Monte de Almeida, pelo convívio mais que agradável no laboratório, além da amizade sempre marcante e importante. À menina “400 V” Maiara Vieira Pinheiro, pela amizade, momentos de descontração e alegria contagiante.

Aos amigos de pós-graduação Agostinho Soares de Alcântara Neto, Victor Hugo Vieira Rodrigues e Raylene Ramos Moura pela amizade gerada no laboratório e o aprendizado que juntos tivemos, além do apoio e momentos de parceria. Aos recém-chegados Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista, Joanna Maria Gonçalves de Souza e Carla Rozilene Guimarães Silva Oliveira pelos novos sopros de ânimo e energia ao laboratório. Em especial, ao “amigo de infância” Ribrio, pelos conselhos sempre pertinentes e reflexivos, cultivados com paciência e amizade, ensinando-me que empatia é mesmo algo importante. Aos alunos de iniciação científica recém-chegados ao LFCR, Iana Sales Campelo, Juliana Barroso Felix e Ana Patrícia Barros Bezerra de Menezes, e todos aqueles que por lá passaram, por terem permitido ensinando, aprender.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal (UBA), Federico Pereyra-Bonnet, Rafael Martín Fernandez, Isabel de la Rosa, Romina Bevacqua, Ramiro Oliveira, Inés Hiriart, Andrés Gambini, Javier Jarazo, Gabriel Vichera, Lucía Moro, Carla Bueno, Norma Bravo e Patricia Mansanet pelos excelentes momentos gerados na convivência do laboratório e por terem proporcionado dias de trabalho prazerosos na capital portenha. Em especial, agradeço ao amigo Fede “Elite” por toda amizade dispensada a minha pessoa, ajuda e palavras de incentivo, além de exemplo de pessoa com grande competência profissional e caráter. Para sempre “mi hermano argentino”. “Amigos, muchas gracias por todo!”.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia e Biotecnologia Animal (UFRGS) em especial a amiga Andrea Galupo pelos momentos alegres de sua convivência. Ao amigo Cristiano Feltrin, que além da alegria contagiante, é um excelente profissional, sempre com palavras de incentivo e força.

Aos funcionários Antônio Cesár Camelo, Selmar Alves da Silva, Cícero Pereira do Nascimento pelo auxílio nas atividades, respeito e amizade.

Ao coordenador, prof. Marcos Fábio Gadelha Rocha, e demais professores do PPGCV pelos ensinamentos e sugestões repassadas durante o período de doutorado, bem como aos funcionários que contribuíram para o funcionamento deste programa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, bem como para o meu aperfeiçoamento como estudante de pós-graduação.

À nunca querer desistir, nunca!

*“Ando devagar porque já tive pressa,
Levo esse sorriso porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe,
Só levo a certeza, de que muito pouco sei, ou nada sei.*

*Conhecer as manhas e as manhãs. O sabor das massas e das maçãs.
É preciso amor pra poder pulsar. É preciso paz pra poder sorrir.
É preciso a chuva para florir.*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente compreender a marcha
E ir tocando em frente.
Como um velho boiadeiro levando a boiada,
Eu vou tocando os dias pela longa estrada. Eu vou. Estrada eu sou.*

*Todo mundo ama um dia, todo mundo chora.
Um dia a gente chega e no outro vai embora.
Cada um de nós compõe a sua história.
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz.”*

(Almir Sater & Renato Teixeira)

RESUMO

O sucesso da produção de animais clones por Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) envolve múltiplas etapas e cada uma destas pode influenciar a eficiência final da técnica. Assim, para investigar fatores relacionados à TNCS em ruminantes, esse trabalho teve como objetivos: (i) avaliar o efeito de um protocolo alternativo de estimulação ovariana (dose única de FSH e eCG) sobre a maturação nuclear e expressão de EGF/EGFR em oócitos e células do *cumulus* oriundos de cabras submetidas à laparoscopia, quando comparado ao tratamento padrão (múltiplas doses de FSH), (ii) investigar a resposta aos danos de DNA em embriões bovinos produzidos por fecundação *in vitro* (FIV), ativação partenogenética (AP) e TNCS através da detecção quantitativa da histona γ H2A.X, (iii) produzir e transferir embriões obtidos por *Handmade Cloning* (HMC) utilizando células doadoras derivadas de um caprino transgênico para o Fator Estimulante das Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF). Em ambos os protocolos para estimulação ovariana, nenhuma diferença foi observada entre o número de oócitos recuperados por animal ($11,7 \pm 4,9$ vs. $10,8 \pm 4,3$), percentual de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) GI/GII e GIII (73,9% vs. 70,1% e 14,2% vs. 16,8%) e taxa de maturação (49,1% vs. 46,1%) para os regimes padrão e dose única, respectivamente ($P > 0,05$). Por outro lado, os CCOs produzidos em ambos os tratamentos foram diferentes com relação à expressão de EGF e EGFR. Interessantemente, a maturação *in vitro* aumentou a expressão de EGFR em oócitos e células do *cumulus*. Quanto à resposta aos danos ao DNA em embriões bovinos pré-implantacionais, em estádios iniciais do desenvolvimento, pronúcleo 1 (pronúcleo maior) de embriões fecundados mostraram um número de *foci* de γ H2A.X/núcleo quatro vezes maior que em núcleo de embriões 1-cell de TNCS ($309,5 \pm 70,2$ vs. $73,7 \pm 17,6$, respectivamente, $P < 0,05$). Por outro lado, ambos os parâmetros (número de *foci* de γ H2A.X/núcleo e área de cromatina danificada/núcleo) foram maiores em blastocistos derivados de AP quando comparados aos embriões FIV e TNCS ($P < 0,05$). Tal ocorrência refletiu numa alta taxa de blastocistos partenotos quando comparado com os outros grupos (FIV e TNCS). Em relação à dinâmica da γ H2A.X durante o desenvolvimento em embriões produzidos pelos diferentes processos, ambos os parâmetros não diferiram entre embriões fecundados (1-célula e 2-células). Interessantemente, blastocistos produzidos por FIV mostraram uma redução em relação aos dois parâmetros quando comparado a embriões 1-célula ($134,7 \pm 30,6$ vs. $493,0 \pm 111,1$ para o número de γ H2A.X *focus*/núcleo e $1511,8 \pm 365,0$ vs. $11491,7 \pm 3046,8$ pixels para a área da cromatina danificada/núcleo, respectivamente, $P < 0,05$). Em relação ao desenvolvimento de embriões TNCS, a área da cromatina danificada/núcleo em embriões clones foi reduzida em blastocistos quando comparado a embriões precoces ($1622,1 \pm 641,4$ vs. $3074,3 \pm 654,8$ vs. $12578,9 \pm 6014,5$ para blastocistos, 1-célula e 2-células, respectivamente, $P < 0,05$). Quanto à produção de embriões caprinos clones por HMC, a taxa de clivagem, mórula e blastocisto em embriões reconstruídos foram de 87,3% (131/150), 18,0% (27/150) e 12,7% (19/150), respectivamente. Nenhuma receptora recebendo embriões reconstruídos foi diagnosticada prenhe no 35º dia. Em conclusão, a TNCS é uma técnica multifatorial e os progressos em todas as suas etapas contribuem de maneira significativa para simplificar e melhorar sua eficiência.

Palavras-chave: Ruminantes. TNCS. EGF. EGFR. γ H2A.X. *Handmade Cloning*. Transgênese.

ABSTRACT

The success of production of cloned animals by Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) involves multiple steps and each of these may influence the final efficiency of the procedure. Thus, to investigate factors related with the SCNT in ruminants, this work had as aims: (i) to evaluate the effect of an alternative protocol for goat ovarian stimulation (one-shot of FSH plus eCG) on nuclear maturation and EGF/EGFR expression in oocytes and *cumulus* cells from goats submitted to laparoscopy, when compared to standard treatment (FSH multi-doses), (ii) to investigate the DNA damage response in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF) parthenogenetic activation and SCNT by quantitative detection of histone γ H2A.X, (iii) to produce and transfer embryos obtained by Handmade Cloning (HMC) using donor cells derived of a human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) transgenic goat. In both protocols for ovarian stimulation, no difference was observed in the number of recovered oocytes per animal (11.7 ± 4.9 vs. 10.8 ± 4.3), percentage of recovered GI/GII and GIII *cumulus*-oocyte complexes (COCs) (73.9% vs. 70.1% and 14.2% vs. 16.8%) and nuclear maturation rate (49.1% vs. 46.1%) for standard and one-shot regimes, respectively ($P > 0.05$). On the other hand, the COCs produced by both treatments were somewhat different concerning EGF and EGFR gene expressions. Interestingly, the *in vitro* maturation increased the EGFR expression in both oocytes and *cumulus* cells. For DNA damage response in bovine preimplantation embryos, in early developmental stages, pronucleus 1 (large size pronuclei) of fertilized embryos show a number of γ H2A.X *focus*/nucleus four times greater than nucleus of SCNT 1-cell embryos (309.5 ± 70.2 vs. 73.7 ± 17.6 , respectively, $P < 0.05$). On the other hand, both parameters (number of γ H2A.X *focus*/nucleus and chromatin area with damage/nucleus) were greater in PA-derived blastocysts when compared to IVF and SNCT embryos ($P < 0.05$). Such occurrence reflected in a high blastocyst rate in parthenotes when compared with other groups (IVF and TNCS). In relation to γ H2A.X dynamics during the development in embryos produced by different process, both the parameters did not differ between fertilized (1-cell and 2-cell) embryos. Interestingly, blastocysts produced by IVF show a reduction in relation to two parameters when compared to 1-cell embryos (134.7 ± 30.6 vs. 493.0 ± 111.1 to number of γ H2A.X *focus*/nucleus and 1511.8 ± 365.0 vs. 11491.7 ± 3046.8 pixels to chromatin area with damage/nucleus, respectively, $P < 0.05$). In comparison to development of SCNT embryos, the chromatin area with damage in TNCS embryos was reduced in blastocysts when compared to early embryos (1622.1 ± 641.4 vs. 3074.3 ± 654.8 vs. 12578.9 ± 6014.5 for blastocyst, 1-cell and 2-cell, respectively, $P < 0.05$). For the production of goat transgenic cloned embryos, cleavage, morulae and blastocyst rates in reconstructed embryos were 87.3% (131/150), 18.0% (27/150) and 12.7% (19/150), respectively. No recipient receiving reconstructed embryos were pregnant on Day 35. In conclusion, SCNT is a multifactorial technique and advances in all their steps will contribute to simplifying and improving its efficiency.

Keywords: Ruminants. SCNT. EGF. EGFR. γ H2A.X. *Handmade Cloning*. Transgenesis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Diferentes formas animais clonadas por transferência nuclear.....	25
Figura 2. Apresentação esquemática dos diferentes eventos da TNCS em ruminantes.....	26
Figura 3. Evolução da gestação em receptoras bovinas após transferência de embriões produzidos <i>in vitro</i> (GI), oriundos de células embrionárias (GII), células somáticas fetais (GIII) ou células somáticas adultas (GIV).....	34
Figura 4. Relação entre competência de desenvolvimento do oócito bovino até o estágio de blastocisto e diâmetro oocitário.....	38
Figura 5. Perfil oscilatório do MPF durante a retomada da meiose e alcance da MII.....	41
Figura 6. Formação de <i>foci</i> de γ H2A.X seguida de reparo do DNA.....	48
Figura 7. Empacotamento da cromatina em eucariotos.....	49

CAPÍTULO I

Figure 1. Specificity of EGF, EGFR and GAPDH qRT-PCR amplifications in oocytes and <i>cumulus</i> cells.....	72
Figure 2. Real-time RT-qPCR analysis of EGF and EGFR expression in goat (A) immature oocytes and (B) <i>cumulus</i> cells from graded COCs obtained from the standard or one-shot treatments for ovarian stimulation.....	73
Figure 3. Real-time RT-qPCR analysis of EGF and EGFR expression in goat (A) oocytes and (B) <i>cumulus</i> cells from pre- and post-IVM COCs obtained from the standard or one-shot treatment for ovarian stimulation.....	74

CAPÍTULO II

Figure 1. Representative confocal laser scanning micrographs of the γ H2A.X in bovine preimplantation zygotes and embryos.....	91
Figure 2. Linear regression between number of γ H2A.X <i>focus</i> /nucleus and chromatin area	

with damage/nucleus of all nucleus derived of bovine *in vitro* fertilized (IVF), parthenogenetically activated (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos.....92

Figure 3. Number of γ H2A.X *focus* per nucleus in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF), parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT).....93

Figure 4. Chromatin with area damage per nucleus in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF), parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT).....94

CAPÍTULO III

Figure 1. Cloned hG-CSF transgenic goat embryos produced by the HMC method..... 110

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Momento da enucleação de citoplastos receptores para reconstrução embrionária em diferentes espécies de ruminantes.....	27
Tabela 2. Produção de ruminantes derivados da transferência nuclear de diferentes tipos celulares.....	29
Tabela 3. Produção de crias oriundas de transferência nuclear após diferentes protocolos de ativação artificial em bovinos, caprinos e ovinos.....	32
Tabela 4. Determinação da duração de cada estado cromossômico a cada momento da meiose na espécie bovina.....	38

CAPÍTULO I

Table 1. Primers employed to obtain quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in goat oocytes and <i>cumulus</i>	69
Table 2. Production <i>cumulus</i> -oocyte complexes (COCs) by laparoscopic recovery in hormonally treated goats for ovarian stimulation and <i>in vitro</i> maturation (IVM).....	70

CAPÍTULO II

Table 1. <i>In vitro</i> development of bovine embryos produced by <i>in vitro</i> fertilization (IVF), parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT).....	89
--	----

CAPÍTULO III

Table 1. Number of aspirated follicles and recovery and maturation rates for goat <i>cumulus</i> -oocyte complexes (COCs) obtained from slaughterhouse ovaries.....	107
--	-----

Tabela 2. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> development of hG-CSF (human Granulocyte Colony Stimulating Factor) transgenic goat embryos produced by handmade cloning (HMC).....	108
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS

- 1C = embrião de uma célula ou zigoto
- 2C = embrião de duas células
- 6-DMAP = 6-dimetilaminopurina
- AMPc = Adenosina Monofosfato Cíclica
- ATB = Antibiotic
- ATM = Ataxia-Telangiectasia Mutated
- Bl = Blastocisto
- CO₂ = Dióxido de carbono
- CaCl₂ = Cloreto de cálcio
- cDNA = DNA complementar
- CEUA/UECE = Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual do Ceará
- cm = Centímetro
- CTNBio = Comissão Técnica Nacional de Biosegurança Nacional
- COCs = *Cumulus* Oocyte Complexes
- DSB = Double Strand Break
- E = Efficiency
- eCG = Gonadotrofina Coriônica Equina
- EGF = Fator de Crescimento Epidermal
- EGFR = Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
- EP = Erro Padrão
- FBS = Fetal Bovine Serum
- FCS = Fetal Calf Serum
- FITC = Fluorescein Isothiocyanate
- FSH = Hormônio Folículo Estimulante
- GAPDH = Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- g = Grama
- hG-CSF = Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano
- hG-CSF = Human Granulocyte Colony Stimulating Factor
- H₂O = Água
- HMC = Handmade Cloning
- IA = Inseminação Artificial

- IGF-1 = Fator de Crescimento semelhante à insulina 1
- IGF-2 = Fator de Crescimento semelhante à insulina 2
- IVF = *In Vitro* Fertilization
- IVM = *In Vitro* Maturation
- IVP = *In Vitro* Production
- KCl = Cloreto de potássio
- kg = Kilograma
- kV = Kilovolts
- LFCR = Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução
- LH = Hormônio Luteinizante
- LOR = Laparoscopic Oocyte Recovery
- LOS = Large Offspring Syndrome
- mRNA = RNA mensageiro
- MII = Mature oocytes
- $MgCl_2$ = Cloreto de magnésio
- min = Minuto
- $MgSO_4$ = Sulfato de magnésio
- MIV = Maturação *in vitro*
- MPF = Fator Promotor da Maturação
- mm = Milímetro
- mM = Milimolar
- mL = Mililitro
- n = Número
- n = Ploidia nuclear
- NaCl = Cloreto de sódio
- $NaHCO_3$ = Carbonato de sódio
- NaH_2PO_4 = Fosfato de sódio dibásico
- NC = Non-competent
- P = Probabilidade
- PA = Parthenogenetic activation
- PB = polar body
- PCR = Reação em Cadeia de Polimerase
- PHA-P = Phytohemagglutinin

- PIVE = Produção *in vitro* de embriões
- PN = Pronuclear
- PVA = Álcool polivinílico
- R^2 = Pearson correlation coefficient
- RNA = Ácido ribonucléico
- ROL = Recuperação Oocitária por Laparoscopia
- SCNT = Somatic Cell Nuclear Transfer
- SFB = Soro Fetal Bovino
- SOF = Synthetic Oviductal Fluid
- TALPH = meio TALP tamponado com HEPES
- TCM199 = Tissue culture medium 199
- TME = Transição Materno-Embrionária
- TNCS = Transferência Nuclear de Células Somáticas
- TE = Transferência de Embriões
- UV = Luz ultravioleta
- WOW = Well-of-the-Well
- μg = Micrograma
- μL = Microlitro
- μM = Micromolar
- $\gamma\text{H2A.X}$ = H2A.X fosforilada
- *vs* = *versus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
PARTE I: Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) em ruminantes:	
progressos e perspectivas atuais.....	24
1.1. Definição, Histórico e Aplicações.....	24
1.2. Técnica de TNCS.....	26
1.2.1. Seleção e preparo de citoplastos receptores.....	26
1.2.2. Seleção e cultivo de células doadoras de núcleo.....	29
1.2.3. Reconstrução e cultivo do embrião.....	30
1.2.4. Transferência de embrião reconstruído e fertilidade da receptora.....	32
1.3. Patologias associadas à técnica de TNCS.....	33
1.4. Desenvolvimento das crias nascidas.....	35
1.5. Enucleação manual (<i>Handmade Cloning</i>).....	35
PARTE II: Papel do oócito na técnica de TNCS.....	36
2.1. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	36
2.1.1. Critérios para identificação de oócitos maturados <i>in vitro</i>	38
2.1.1.1. Expansão das células do <i>cumulus</i> e seu papel na MIV.....	39
2.1.1.2. Maturação nuclear e citoplasmática.....	39
2.1.2. Regulação do MPF.....	40
2.2. Aspectos moleculares do oócito.....	42
2.3. Importância do oócito para a técnica de TNCS.....	44
PARTE III: Condições de cultivo <i>in vitro</i> de embriões clones.....	44
3.1. Efeito das condições <i>in vitro</i> sobre o desenvolvimento embrionário.....	44
3.2. Danos ao DNA gerados pelas condições artificiais e mecanismos de reparo envolvendo γ H2A.X.....	47
3. JUSTIFICATIVA.....	50
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	51
4.1. Capítulo I.....	51
4.2. Capítulo II.....	51
4.3. Capítulo III.....	51
5. OBJETIVOS.....	52
5.1. Geral.....	52
5.2. Específicos.....	52

5.2.1. Capítulo I.....	52
5.2.2. Capítulo II.....	52
5.2.3. Capítulo III.....	52
6. CAPÍTULO I.....	53
7. CAPÍTULO II.....	75
8. CAPÍTULO III.....	95
9. CONCLUSÕES.....	111
9.1. Capítulo I.....	111
9.2. Capítulo II.....	111
9.3. Capítulo III.....	111
10. PERSPECTIVAS.....	112
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
12. APÊNDICES.....	140
12.1. APÊNDICE A.....	140
12.2. APÊNDICE B.....	141
12.3. APÊNDICE C.....	142
12.4. APÊNDICE D.....	143
12.5. APÊNDICE E.....	144
12.6. APÊNDICE F.....	145
12.7. APÊNDICE G.....	146
12.8. APÊNDICE H.....	147
12.9. APÊNDICE I.....	148

1. INTRODUÇÃO

Desde o nascimento da ovelha Dolly, em 1996, utilizando células somáticas adultas como doadoras de núcleo (WILMUT *et al.*, 1997), a Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) ou clonagem animal é uma técnica que vem sendo sucessivamente aplicada para a produção de embriões e crias em diferentes espécies de ruminantes, tais como bovinos (CIBELLI *et al.*, 1998), caprinos (BAGUISI *et al.*, 1999), bubalinos (SHI *et al.*, 2007), cervídeos (BERG *et al.*, 2007) e camelídeos (WANI *et al.*, 2010). Em geral, a TNCS consiste em transferir núcleos de células doadoras para o interior de oócitos enucleados, resultando na produção de indivíduos geneticamente idênticos ao animal doador de núcleo, denominados de clones. O princípio básico da técnica reúne-se em duas etapas: a primeira consiste na utilização de oócitos como citoplasma receptor após o processo de enucleação, enquanto a segunda consiste em reconstruir o embrião e transferi-lo para uma receptora sincronizada.

A produção animal utilizando a biotécnica de clonagem pode ser empregada em diferentes setores de investigação básica e aplicada. Essa técnica pode ser utilizada para conhecer as interações entre o núcleo e o citoplasma durante a reprogramação celular (GAO *et al.*, 2007), contribuindo para o progresso na área de biologia do desenvolvimento. Além disso, a TNCS pode produzir em larga escala rebanhos com características geneticamente importantes para a produção e reprodução (BHOJWANI *et al.*, 2005), bem como para a conservação e recuperação de recursos genéticos (FOLCH *et al.*, 2009). Outra aplicabilidade e, talvez a mais interessante e promissora, é a utilização da TNCS na produção e multiplicação de animais transgênicos produtores de proteínas recombinantes que auxiliariam em novas alternativas de tratamento em humanos (BAGUISI *et al.*, 1999). Desde 2006 (FREITAS *et al.*, 2007a), nosso laboratório vem produzindo caprinos transgênicos para o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF) utilizando a técnica de microinjeção pronuclear. Recentemente, com o nascimento de um casal de caprinos transgênicos (FREITAS *et al.*, 2010), nosso grupo vem buscando com a técnica de TNCS promover a multiplicação desses animais.

Apesar de todas estas aplicações e sua utilização em diferentes laboratórios, o sucesso da reconstrução embrionária é ainda limitado em virtude de muitos fatores. Uma variedade de razões tem sido relacionada como responsável por esta baixa eficiência, tais como o tipo de célula doadora, a fonte e a qualidade do oócito ao início da maturação, o método de cultivo embrionário, as falhas da reprogramação nuclear, a variação entre laboratórios e as metodologias empregadas para as etapas de enucleação oocitária e reconstrução embrionária (CAMPBELL *et al.*, 2005).

No que diz respeito às etapas iniciais do desenvolvimento embrionário, estudos têm mostrado que o desenvolvimento e a sobrevivência embrionária, as taxas de prenhez e os nascimentos de indivíduos a partir de embriões produzidos em cultivo *in vitro* estão relacionadas com os eventos iniciais durante a maturação oocitária (WEBB *et al.*, 2007). Nesse sentido, a otimização da produção de oócitos torna-se um importante alvo de investigação em virtude da constante necessidade de oócitos em quantidade e qualidade para a TNCS.

Em caprinos, uma das possibilidades para produzir tais oócitos para a etapa de maturação *in vitro* (MIV) é através do uso de protocolos que combinam estimulação do desenvolvimento folicular *in vivo* e colheita oocitária por laparoscopia (COL) (BALSASSARRE *et al.*, 1994). Nosso grupo tem estudado tais protocolos para a produção de oócitos visando à produção *in vitro* de embriões por fecundação *in vitro* (FIV) e TNCS, analisando os aspectos moleculares desses oócitos recuperados. Recentemente, nosso laboratório investigou a expressão do receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) como um parâmetro de qualidade de oócitos recuperados de tratamentos utilizando somente doses de FSH (ALMEIDA *et al.*, 2010). Por outro lado, na espécie caprina, o uso de regimes hormonais com uma única dose de FSH associada com eCG tem mostrado ser tão eficiente quanto aos métodos convencionais utilizando múltiplas doses de FSH (BALSASSARRE *et al.*, 1996; 2002). Contudo, informações sobre os níveis de expressão do sistema EGF-EGFR relacionados à competência meiótica de oócitos recuperados de tratamentos associando FSH e eCG ainda não são totalmente esclarecidas.

Outra vertente dentro da técnica de TNCS consiste em investigar os danos ao material genético gerados durante o cultivo *in vitro* de embriões pré-implantacionais. Vários estudos têm investigado as condições e os sistemas de cultivo *in vitro*, correlacionando com danos ao DNA (TAKANASHI *et al.*, 1999; LONERGAN & FAIR, 2008). O aumento de danos ao DNA causado, por exemplo, pelas concentrações de oxigênio em sistemas de cultivo foi positivamente correlacionado com uma reduzida competência de desenvolvimento de embriões bovinos (TAKANASHI *et al.*, 1999). Por esta razão, as respostas do embrião a esses danos são necessariamente importantes para assegurar a transmissão da informação genética intacta (FERNANDES-CAPETILLO *et al.*, 2003; STIFF *et al.*, 2004).

Durante o período pré-implantacional, o desenvolvimento dos embriões requer uma maquinaria de reparo do DNA eficiente para que os danos que ocorram durante este período não sejam transmitidos para o ciclo celular subsequente, podendo resultar na morte das células por apoptose. Uma das respostas da célula ao dano do material genético é a fosforilação de histonas, utilizada como um sinalizador desses danos. A fosforilação da histona H2A.X (γ H2A.X) forma *foci* em sítios de danos ao DNA, sendo utilizada como uma plataforma de recrutamento de várias

proteínas de reparo (FERNANDEZ-CAPETILLO *et al.*, 2004). Assim, a γ H2A.X apresenta papéis importantes no reparo do DNA e remodelação da cromatina durante a resposta aos danos. Nesse sentido, a detecção qualitativa e quantitativa da γ H2A.X em embriões pré-implantacionais poderá ser um ponto de partida na investigação das anomalias resultantes de falhas na reprogramação celular.

Em geral, os procedimentos de TNCS convencional empregam equipamentos sofisticados e requer habilidade técnica. A técnica de Handmade Cloning (HMC) simplificou o processo. Esta técnica tem sido desenvolvida exatamente para suprir a necessidade de micromanipuladores, utilizando para tanto oócitos livres de zona pelúcida (PEURA *et al.*, 1998; VAJTA *et al.*, 2001). Embora a produção de embriões clones baseada na micromanipulação convencional tenha alcançado sucesso em diferentes espécies (LAGUTINA *et al.*, 2007), a técnica de HMC têm sido considerada uma tecnologia com equivalente eficiência, mostrando que o HMC pode ser utilizado como um método alternativo para a geração de produtos clones (TECIRLIOGLU *et al.*, 2005).

Em caprinos, vários estudos obtiveram produtos clones (LAN *et al.*, 2006) e transgênicos (BAGUISI *et al.*, 1999; KEEFER *et al.*, 2001) oriundos de metodologias convencionais de TNCS. Somente um grupo já relatou a produção de blastocistos clones caprinos utilizando o método de HMC (AKSHEY *et al.*, 2008; 2010). Contudo, não é de nosso conhecimento nenhuma informação sobre a aplicabilidade da técnica de HMC na produção de embriões caprinos transgênicos clones.

Desta maneira, a fim de investigar diferentes fatores relacionados à TNCS em ruminantes, essa tese apresenta três segmentos: (I) investigação dos aspectos moleculares do oócito caprino a ser utilizado em etapas posteriores da TNCS; (II) compreensão do desenvolvimento pré-implantacional *in vitro* de embriões clones bovinos através da detecção qualitativa e quantitativa de danos ao material genético com γ H2A.X e (III) aplicabilidade da técnica de HMC na multiplicação de caprinos transgênicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

PARTE I*: TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS) EM RUMINANTES: PROGRESSOS E PERSPECTIVAS ATUAIS

* A parte I dessa revisão de literatura é uma atualização do artigo intitulado “*Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais*”, publicado na **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 33, 118-128, 2009, de autoria de Pereira, A.F. & Freitas, V.J.F.

1.1. Definição, Histórico e Aplicações

Durante várias décadas, diferentes grupos de pesquisa, buscando conhecer os aspectos fisiológicos e embrionários envolvidos na reprodução, bem como obter descendentes de animais geneticamente valiosos, estudaram a utilização de um conjunto de técnicas como ferramentas para a realização de tais objetivos. Seguindo esta temática, biotécnicas de última geração foram desenvolvidas, em especial, a Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) ou clonagem. O princípio da técnica reúne-se em duas etapas: a primeira consiste na utilização de oócitos como citoplasma receptor após o processo de enucleação, enquanto a segunda consiste em reconstruir o embrião e transferi-lo para uma receptora sincronizada.

A transferência nuclear foi originalmente proposta por SPEEMANN (1938), sendo utilizada como ferramenta para conhecer o papel do material genético na diferenciação celular em anfíbios. Posteriormente, BRIGGS & KING (1952) realizaram a primeira transferência nuclear em anfíbios e, subsequente, GURDON (1962) e GURDON & UEHLINGER (1966) mostraram o potencial de reprogramação de células diferenciadas utilizando *Xenopus* adultos.

Em mamíferos, o desenvolvimento da transferência nuclear ocorreu lentamente, sendo somente descrita a partir de 1975 em coelhos (BROMHALL, 1975). Posteriormente, a técnica pode ser realizada em espécies de ruminantes, tais como ovinos (WILLADSEN, 1986) e bovinos (PRATHER *et al.*, 1987), sendo esses animais clones produzidos a partir da utilização de blastômeros como fontes doadoras de núcleos.

Partindo da necessidade de aperfeiçoar a técnica, estudos subsequentes permitiram verificar que células completamente diferenciadas poderiam ser usadas em programas de transferência nuclear. O ápice desta afirmativa aconteceu quando do nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero clonado por esta técnica (WILMUT *et al.*, 1997). Posteriormente, o sucesso em outras espécies de ruminantes foi alcançado, já tendo sido observado em bovinos (CIBELLI *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 1998), caprinos (BAGUISI *et al.*, 1999), gaur (LANZA *et*

al., 2000), bubalinos (SHI *et al.*, 2007), cervídeos (BERG *et al.*, 2007), camelídeos (SANSINENA *et al.*, 2003; WANI *et al.*, 2010), além de outras espécies animais (**Figura 1**).

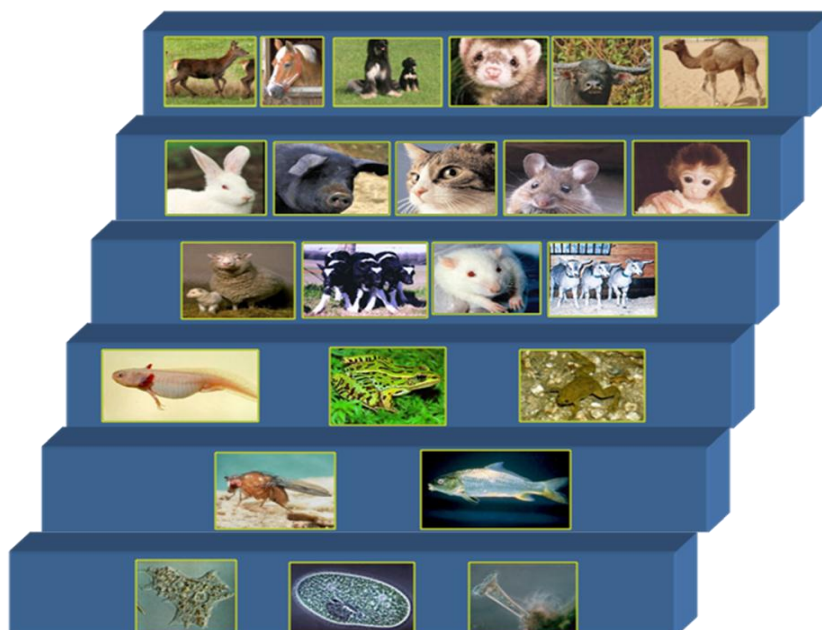


Figura 1. Diferentes formas animais clonadas por transferência nuclear. Da esquerda para direita: **Degrau 1**, Ameba unicelular, *Paramecium* e *Stentor*; **Degrau 2**, inseto (*Drosophila*) e zebrafish (carpa, medaka); **Degrau 3**, anfíbios urodeles (*Ambystoma mexicanum* e *Pleurodeles waltlii*) e anuros (*Rana pipiens* e *Xenopus laevis*); **Degrau 4**, ovinos; bovinos; murinos; caprinos; **Degrau 5**, leporídeos, suínos, felinos, murinos e primatas; **Degrau 6**: cervídeos, eqüinos, carnívoros, furão doméstico, bubalinos e camelídeos (Adaptado de BERARDINO, 2006).

Dentre as várias aplicações da técnica, podem ser citadas aquelas que visam conhecer a interação núcleo-citoplasma na reprogramação nuclear. Além disso, a TNCS atende a programas de multiplicação de animais com características genéticas desejáveis. A técnica também se apresenta como uma ferramenta para uso com transgênese a partir da utilização de linhagens celulares que receberam genes específicos (BEHBOODI *et al.*, 2002), tornando-se uma alternativa viável para a produção de animais transgênicos quando comparada aos métodos convencionais, ex.: microinjeção pronuclear (FREITAS *et al.*, 2007a). Dessa forma, a TNCS pode servir para a produção de animais transgênicos portadores de proteínas recombinantes que auxiliariam em novas alternativas de tratamento em humanos (FREITAS, 2006; FREITAS *et al.*, 2007b). Outra aplicação da TNCS é seu uso na conservação e na regeneração dos recursos genéticos.

Apesar de vários estudos sobre o assunto, a TNCS ainda apresenta baixa eficiência, além de complicações observadas nos produtos obtidos. Desta maneira, a parte I desta revisão apresenta como propósito conceituar a TNCS em suas várias etapas, destacando os principais fatores que interferem no seu sucesso, buscando compreender os diferentes eventos envolvidos e evidenciando avanços obtidos em ruminantes.

1.2. Técnica de TNCS

A produção de ruminantes pela técnica de TNCS envolve múltiplas etapas, cada uma podendo influenciar diretamente no resultado final. De forma sucinta são as seguintes as principais etapas do processo: seleção e preparo de citoplastos receptores adequados, seleção e cultivo de células doadoras de núcleo, reconstrução embrionária compreendendo as etapas de fusão e ativação celular, cultivo dos embriões reconstruídos e transferência para receptoras sincronizadas (**Figura 2**).

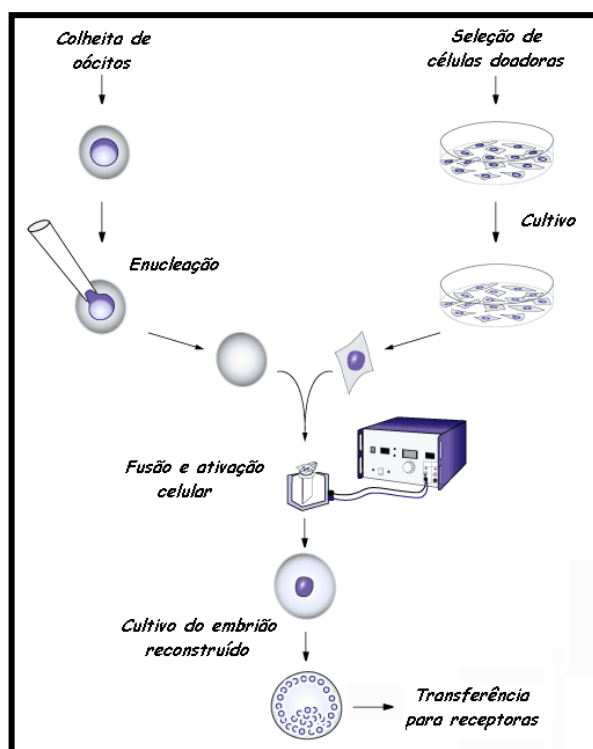


Figura 2. Apresentação esquemática dos diferentes eventos da TNCS em ruminantes.

1.2.1. Seleção e preparo de citoplastos receptores

A fonte e a qualidade do citoplasma receptor (citoplasto) representam fatores importantes para o sucesso da técnica de TNCS. Neste sentido, vários estudos já foram desenvolvidos buscando avaliar o estágio nuclear adequado deste citoplasto em programas de transferência

nuclear (**Tabela 1**). Contudo, diferentes estudos têm mostrado que oócitos em metáfase II (MII) são mais adequados para suportar a reprogramação nuclear quando comparados aos demais estádios de desenvolvimento já empregados (ZOU *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2007). Por esta razão, a maioria das pesquisas relata o uso de oócitos em MII maturados *in vivo* (OHKOSHI *et al.*, 2003) ou *in vitro* (ZHOU *et al.*, 2007) como o citoplasto de escolha.

Tabela 1. Momento da enucleação de citoplastos receptores para reconstrução embrionária em diferentes espécies de ruminantes.

Estádio nuclear	Espécie	Referência
Anáfase-telófase I	Ovina	CAMPBELL <i>et al.</i> (1996); WILMUT <i>et al.</i> (1997)
Metáfase II	Bovina	KATO <i>et al.</i> (2000); DO <i>et al.</i> (2001)
Telófase II	Bovina	BORDIGNON & SMITH (1998)
	Caprina	BAGUISI <i>et al.</i> (1999)
Zigoto pró-nuclear	Bovina	PRATHER & FIRST (1990)
Embrião no estágio 2 cél.	Ovina	WELLS <i>et al.</i> (1997)

Adaptado de CAMPBELL *et al.* (2005).

O uso de oócitos maturados *in vitro* apresenta uma série de vantagens quando comparados àqueles maturados *in vivo*. Tem sido demonstrada uma variedade de fatores que interferem negativamente sobre a qualidade de oócitos maturados *in vivo*, dentre os quais podem ser citados a idade da doadora e o protocolo de superestimulação ovariana (CAMPBELL *et al.*, 2007). Já os oócitos maturados *in vitro* têm sido muito utilizados, primeiro, porque geralmente se utilizam ovários oriundos de abatedouros, o que resulta em baixo custo e em significativa quantidade de oócitos e, segundo, porque possibilita um maior controle dos estádios da maturação. Adicionalmente, oócitos para MIV podem ser obtidos *in vivo* por meio da punção folicular de ovários superestimulados (BORDIGNON *et al.*, 1997; KEEFER *et al.*, 2002). Assim, diferentes estudos têm mostrado a eficiência destes oócitos na produção de blastocistos clones em diferentes espécies, como: caprinos (BAGUISI *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2004), bovinos (LEE *et al.*, 2007), ovinos (CAMPBELL *et al.*, 1996), bubalinos (MEENA & DAS, 2006) e camelídeos (SANSINENA *et al.*, 2003). Em algumas espécies cuja disponibilidade de oócitos é pequena, a possibilidade de utilizar oócitos de outras espécies como citoplastos receptores tem sido o método proposto. Os resultados obtidos usando esta técnica sugerem que os citoplasmas obtidos de uma espécie podem adquirir a competência necessária para atuarem

como receptores de núcleos em uma espécie diferente (SANSINENA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2007).

As condições para a maturação são similares àsquelas para a produção *in vitro* de embriões (PIVE), ou seja, meio TCM 199 suplementado com hormônios e antibióticos, mantidos em temperatura de 38,5–39,0°C durante 16–24 h em atmosfera com umidade saturada contendo 5% de CO₂ em ar. Embora meios de maturação sejam suplementados com outros fatores como estradiol, fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e cisteamina, nenhuma diferença na produção de animais saudáveis tem sido verificada (KEEFER *et al.*, 2001; ARAT *et al.*, 2002; KEEFER *et al.*, 2002). KEEFER *et al.* (2001) observaram que oócitos caprinos maturados em TCM199 suplementado com soro de cabra em estro apresentaram uma taxa de maturação superior quando comparados a oócitos maturados em TCM199 acrescido de soro fetal bovino (SFB; 86% vs. 69%, respectivamente).

Para utilizar oócitos como citoplastos receptores na técnica de TNCS, o material nuclear deve ser removido, resultando apenas no seu conteúdo citoplasmático. Em geral, este objetivo é atingido por aspiração da placa metafásica de oócitos em MII juntamente com o corpúsculo polar, usando micropipetas acopladas a micromanipuladores (LI *et al.*, 2004). O conteúdo nuclear de oócitos em MII não é facilmente visível por microscopia óptica em virtude da presença de lipídeos citoplasmáticos. Por isso, antes do processo de enucleação, o oócito é marcado com Hoechst 33342, o qual apresenta uma fluorescência em azul quando exposto à luz ultravioleta (UV). Desta maneira, a remoção do material nuclear é confirmada pela ausência de fluorescência no oócito após a enucleação. Contudo, estudos têm mostrado um efeito negativo da exposição do oócito à luz UV (VELILLA *et al.*, 2002). Conseqüentemente, tem sido recomendado não expor o citoplasma a esta radiação, mas sim apenas a porção removida presente na pipeta de aspiração (CHESNÉ, 2006).

Uma alternativa para a enucleação de oócitos em MII, a fim de se obter maior eficiência, é a remoção do material nuclear de oócitos ativados em telófase II. A aspiração mecânica de um pequeno volume de citoplasma adjacente à extrusão do segundo corpúsculo polar após a ativação é um método efetivo, não sendo necessário a visualização do DNA pela exposição à luz UV, uma vez que a cromatina ainda permanece justaposta ao segundo corpúsculo polar (CAMPBELL *et al.*, 2007).

Além do método de enucleação por aspiração mecânica, existe ainda o método químico, o qual consiste na remoção do material nuclear pelo uso de inibidores de topoisomerase (HYTTER *et al.*, 2001). Outra possibilidade é o uso da combinação etanol e demecolcina (IBÁÑEZ *et al.*, 2003). Contudo, citoplastos preparados quimicamente resultam em baixas taxas de clivagem e

não produzem desenvolvimento embrionário adequado, quando comparados aos métodos de enucleação convencionais (CAMPBELL *et al.*, 2005).

1.2.2. Seleção e cultivo de células doadoras de núcleo

A origem do núcleo doador utilizado para transferência nuclear pode ter efeitos importantes sobre a capacidade de desenvolvimento de embriões reconstruídos até o estágio de blastocisto, bem como sobre o desenvolvimento fetal pós-implantação. Com a obtenção do primeiro mamífero a partir de células embrionárias em cultivo (WILLADSEN *et al.*, 1986) e de linhagens fetais e adultas (WILMUT *et al.*, 1997), numerosas pesquisas foram desenvolvidas evidenciando que células somáticas de diferentes tecidos e idades podem ser utilizadas com sucesso em programas de transferência nuclear (**Tabela 2**). Estudos indicam que diferentes células doadoras podem ser reprogramadas. Contudo, o modelo celular mais utilizado continua sendo o de fibroblastos obtidos de biópsias de feto ou de animais adultos, da pele ou do músculo (CHESNÉ, 2006).

Tabela 2. Produção de ruminantes derivados da TN de diferentes tipos celulares.

Espécie	Data	Idade do animal doador	Tipo celular	Referência
Ovina	1996	Feto	Fibroblasto	WILMUT <i>et al.</i> , 1997
	1996	Adulto	Epitélio mamário	WILMUT <i>et al.</i> , 1997
Bovina	1998	Feto	Fibroblasto	CIBELLI <i>et al.</i> , 1998
	1998	Adulto	Epitélio ovidutário	KATO <i>et al.</i> , 1998
Caprina	1999	Feto	Fibroblasto	BAGUISI <i>et al.</i> , 1999

Adaptado de CAMPBELL *et al.* (2005).

As células doadoras de núcleo podem ser usadas diretamente após a sua coleta do animal doador (GALLI *et al.*, 1999) ou após um período de cultivo (KUBOTA *et al.*, 2000) antes ou depois da criopreservação. O cultivo prolongado das células doadoras pode alterar a ploidia, estabilidade genômica e provocar modificações nas histonas pós-translação, resultando numa redução da eficiência da técnica (CAMPBELL *et al.*, 2007). As modificações na estrutura da cromatina e alterações epigenéticas são consideradas como os principais fatores determinantes para o sucesso da TNCS (SUTEEVUN *et al.*, 2006). Estudos realizados em ovinos, bovinos e caprinos demonstraram que células no estágio G0 do ciclo celular são competentes ao desenvolvimento de embriões reconstruídos por TNCS (WELLS *et al.*, 1997; KATO *et al.*, 2000; KEEFER *et al.*, 2002; TIBARY *et al.*, 2005).

Os carioplastos derivados de amostras celulares podem ser cultivados em meio Dulbecco suplementado com 10% de SFB em condições de 38,5°C e 5% de CO₂ em ar (KEEFER *et al.*, 2002; HAYES *et al.*, 2005). Após duas semanas, os fibroblastos podem ser tripsinizados e semeados em uma nova placa, resultando na passagem 1 (HILL *et al.*, 2001). Após atingir a confluência, estes podem ser ressemeados em outras placas, sendo as células utilizadas para TNCS após três ou quatro passagens. Estas células são mantidas em confluência ou cultivadas em meio suplementado com 0,5% de soro, a fim de aumentar a proporção de células em G0 e G1 (CHESNÉ, 2006). As células são preparadas por tripsinização 30 min antes de sua utilização para a TNCS, sendo as mesmas lavadas em meio SOF tamponado com HEPES (LAGUTINA *et al.*, 2007).

Linhagens celulares transfectadas com genes de interesse associada com a transferência nuclear tem se tornado um método viável para introdução de DNA exógeno no genoma de animais (CIBELLI *et al.*, 1998). Contudo, uma limitação potencial do uso de fibroblastos adultos transfectados como doadores de núcleo consiste no período de cultivo prolongado necessário para a programação, transfecção, seleção e expansão da linhagem celular. Cada uma destas etapas requer passagens repetidas, bem como períodos de cultivos longos que podem induzir perturbações nas células doadoras, resultando numa redução na eficiência da transferência nuclear (FORSBERG *et al.*, 2001).

1.2.3. Reconstrução e cultivo do embrião

Para a reconstrução do embrião após a TNCS, o núcleo de célula doadora (carioplasto) é transferido para o interior de um citoplasma receptor (citoplasto). Cada célula doadora isolada individualmente com base no cultivo prévio é inserida no espaço perivitelino de um oócito enucleado para posterior estimulação com um pulso elétrico, o qual promove a fusão das membranas adjacentes. O pulso elétrico não somente induz a fusão da célula somática com o oócito enucleado para formar um novo complexo, mas também promove uma importante liberação de cálcio intracelular que inicia o processo de ativação (HEYMAN, 2005).

Em ruminantes, a reconstrução embrionária é geralmente alcançada por eletrofusão, mas esta etapa pode também ser obtida pela injeção intracitoplasmática da célula intacta ou do núcleo isolado. Após a fusão, os embriões reconstruídos por TNCS são submetidos à ativação artificial, a qual deve mimetizar o papel exercido pelos espermatozóides durante a fecundação. Na maioria dos mamíferos os oócitos em MII após a ovulação são fecundados. Durante a maturação oocitária ocorrem uma reorganização e redistribuição específicas de organelas citoplasmáticas, e os oócitos obtêm um complemento de moléculas sinalizadoras (MIYAZAKI *et al.*, 1993). O

evento característico da ativação oocitária é o início das oscilações intracelulares de cálcio, a exocitose de grânulos corticais, o recrutamento de mRNAs, a formação dos pró-núcleos e o início da síntese de DNA (CAMPBELL *et al.*, 2005). Similarmente, na reconstrução embrionária, o citoplasto deve ser ativado para iniciar o subsequente desenvolvimento. De maneira geral, após a transferência de núcleo, a ploidia normal celular é mantida, aguardando a replicação do DNA. O citoplasto receptor que apresenta um alto nível de atividade do Fator Promotor da Maturação (MPF) promove o rompimento da membrana nuclear e a condensação prematura dos cromossomos. A ativação oocitária induz uma redução da atividade do MPF e permite a reconstrução da membrana nuclear. Deste modo, após a replicação do DNA, ocorre a divisão celular no embrião, originando o estágio de 2-células (MIYAZAKI *et al.*, 1993).

A ativação consiste na etapa chave do processo de TNCS e pode ser obtida física e/ou quimicamente, por métodos que podem ou não estar diretamente ligados aos níveis de cálcio intracelular. Quanto aos meios físicos, pode ser citada a injeção de cálcio diretamente no citoplasma, promovendo em seguida estímulos elétricos que promoverão a liberação de concentrações intracelulares de cálcio. Os oócitos também podem ser ativados quimicamente por meio da utilização de cálcio ionóforo, A23187 (CIBELLI *et al.*, 1998), ionomicina (HILL *et al.*, 2001), cicloheximida (KEEFER *et al.*, 2002) ou 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) (SUSKO-PARRISH *et al.*, 1994). Em ruminantes, o uso de cálcio ionóforo seguido por um tratamento com inibidores da atividade de proteínas quinases, tal como a 6-DMAP ou por inibidores de proteínas quinases dependentes de ciclinas por três a seis horas, são os tratamentos mais realizados (KEEFER *et al.*, 2002; SANSINENA *et al.*, 2003).

Vários estudos têm sido desenvolvidos visando avaliar o efeito do intervalo entre a fusão e a ativação sobre o desenvolvimento embrionário (nomeado de tempo de reprogramação), contudo os resultados são conflitantes. Grupos de pesquisadores têm apontado que o contato prolongado entre oócito receptor e núcleo doador pode ser benéfico para os embriões reconstruídos (WELLS *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 2000). WRENZYCKI *et al.* (2001) observaram que o padrão de transcrição de blastocistos bovinos é afetado pelo tempo de contato. Adicionalmente, outros fatores influenciam na eficiência da ativação artificial, tais como: concentração dos agentes que promovem a ativação química, período da estimulação, tratamentos posteriores como a citocalasina B ou D, cicloheximida e 6-DMAP (CAMPBELL *et al.*, 2007). Em ruminantes, diferentes protocolos de ativação mostraram-se eficientes na produção de animais clones (**Tabela 3**).

Após a fusão e a ativação, os embriões reconstruídos são cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto, utilizando uma variedade de sistemas de cultivo rotineiramente usados na PIVE

de embriões, dentre os quais podem ser citados sistemas de co-cultivo utilizando células primárias do oviduto ou linhagens celulares estabelecidas (THOMPSON, 2000). Em geral, o cultivo *in vitro* requer uma suplementação de componentes os quais podem auxiliar no desenvolvimento, mas que, por um período longo de exposição, podem alterar negativamente a qualidade do embrião. Dentre estes componentes podem ser citados: soro fetal bovino, soro de cabra/ovelha em estro, albumina sérica bovina (BSA), fatores de crescimentos e vitaminas, entre outros (Keefer *et al.*, 2001; Tibary *et al.*, 2005).

Tabela 3. Produção de crias oriundas de transferência nuclear após diferentes protocolos de ativação artificial em bovinos, caprinos e ovinos.

Espécie	Ativação	Pós-fusão	Tratamento pós-ativação	Referência
Bovina	Ionóforo (5 µM) por 4 min	2-4 h	6-DMAP (2 mM) por 3 h	CIBELLI <i>et al.</i> , 1998
	Ionóforo (5 µM) por 4 min	4-6 h	6-DMAP (2 mM) por 4 h	WELLS <i>et al.</i> , 1999
	20 V/mm por 20 µs	--	Cicloheximida (10 µg/mL) por 5h	KATO <i>et al.</i> , 2000
Caprina	1,4-1,8 kV/cm por 80 µs	--	Citocalina B (5 µg/mL) por 2 h	BAGUISI <i>et al.</i> , 1999
	Ionicina (5 µM) por 1 min	30 min	6-DMAP (2 mM) por 2 h	LAN <i>et al.</i> , 2006
	Ionóforo (5 µM) por 5 min	2-3 h	6-DMAP (2 mM) por 2,5-4 h	KEEFER <i>et al.</i> , 2002
Ovina	1,25 kV/cm por 70 µs	--	Citocalasina B (7,5 µg/mL) por 1 h	WILMUT <i>et al.</i> , 1997

Adaptado de CAMPBELL *et al.* (2007).

SALAMONE *et al.* (2003), trabalhando com TNCS na espécie bovina, verificaram que embriões cultivados em SOF na ausência de co-cultivo, porém numa atmosfera de três gases (5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂), apresentaram melhores taxas de clivagem e formação de blastocistos quando comparados àqueles tratados em sistemas de co-cultivo. Adicionalmente, estudos realizados por Chesné *et al.* (2003) sugerem que as condições ótimas para o cultivo de embriões bovinos e caprinos consistem em meio B2-INRA-Menezo co-cultivados com células do oviduto ou células Vero.

1.2.4. Transferência de embrião reconstruído e fertilidade da receptora

Em ruminantes, os procedimentos de transferência de embriões podem ser cirúrgicos, semicirúrgicos ou não-cirúrgicos. O método cirúrgico ou laparotomia consiste em exteriorizar o corno uterino e depositar os embriões próximos à junção úterotubária (BAGUISI *et al.*, 1999; KEEFER *et al.*, 2001). Embriões caprinos cultivados por 35 h até o estágio de quatro células são transferidos cirurgicamente para o interior do oviduto com uma média de cinco embriões por receptora (CHESNÉ *et al.*, 2003).

O método semicirúrgico ou semi-laparoscópico é usualmente realizado em caprinos e ovinos (CHESNÉ *et al.*, 2003; BARIL, 2006). Em geral, a técnica consiste em associar a laparoscopia a uma pequena incisão sem a necessidade de expor o animal a uma anestesia geral. Finalmente, o método não-cirúrgico, freqüentemente realizado em bovinos, consiste em inserir, por via transcervical, embriões no corno uterino ipsilateral ao ovário, apresentando pelo menos um corpo lúteo (CIBELLI *et al.*, 1998; CHAVATTE-PALMER *et al.*, 2002).

A taxa de fertilidade de receptoras sincronizadas é variável entre diferentes espécies de ruminantes, bem como entre os grupos de pesquisas. Em bovinos, CIBELLI *et al.* (1998) verificaram que, de um total de 28 embriões transferidos para 11 receptoras, apenas quatro bezerros foram produzidos. Já em lhamas, SANSINENA *et al.* (2003) não observaram nenhum nascimento de 11 embriões transferidos. KEEFER *et al.* (2002), avaliando a eficiência da transferência nuclear em caprinos utilizando fibroblastos fetais e células da granulosa como doadoras de núcleo, de 145 embriões transferidos obtiveram nove animais clones nascidos.

HEYMAN *et al.* (2002) avaliaram a evolução da gestação em diferentes grupos de receptoras bovinas que receberam embriões derivados de PIVE e transferência nuclear por meio de células embrionárias, fetais e adultas. Estes autores verificaram que as taxas de gestações iniciais foram similares nos diferentes grupos quando avaliaram as concentrações de progesterona plasmáticas no 21º dia. Contudo, a freqüência de perdas fetais antes dos dois meses foi duas vezes maior nos grupos de receptoras que receberam embriões derivados de células somáticas fetais e adultas, quando comparado às receptoras que receberam embriões derivados de transferência nuclear de células embrionárias e de FIV (**Figura 3**).

1.3. Patologias associadas à técnica de TN

Uma das principais contradições dos sistemas de cultivo *in vitro* é que seu aprimoramento é geralmente avaliado sobre o percentual de embriões desenvolvidos até o estágio de blastocistos. No entanto, isto não necessariamente é o melhor indicador da qualidade embrionária, em especial em embriões clones que tendem a apresentar reduzidas taxas de prenhez e elevadas perdas embrionárias. Estas últimas têm sido descritas em ovinos (DE SOUSA *et al.*, 2001), lhamas (SANSINENA *et al.*, 2003) e em caprinos (BAGUISI *et al.*, 1999; KEEFER *et al.*, 2002).

Deste modo, diversas anomalias têm sido constatadas durante a gestação e após o nascimento de animais produzidos pela técnica de TNCS. A baixa eficiência e o desenvolvimento anormal de animais são principalmente em virtude da reprogramação incompleta e da expressão gênica anormal. Dentre as principais anomalias, verificam-se:

cardiopatias, placentação anormal, hidroalantóide, deficiência imunológica, disfunção renal, alterações no metabolismo energético e hipertensão pulmonar (YOUNG *et al.*, 1998; HEYMAN, 2005; CAMPBELL *et al.*, 2007).

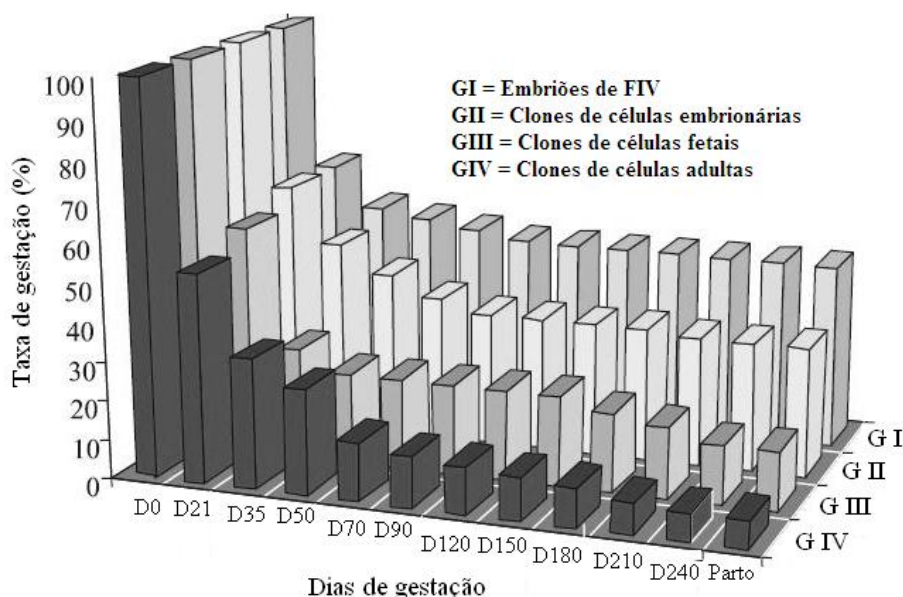


Figura 3. Evolução da gestação em receptoras bovinas após transferência de embriões produzidos *in vitro* (G I), oriundos de células embrionárias (G II), células somáticas fetais (G III) ou células somáticas adultas (G IV). Adaptado de HEYMAN *et al.* (2002).

Em bovinos, perdas peri-implantacionais são importantes e a proporção de perdas de gestações neste período pode ser estimada em 50% (CIBELLI *et al.*, 1998; WELLS *et al.*, 1997). Essas perdas precoces são frequentemente associadas com deficiências funcionais que ocorrem no início da placentação, caracterizada por vascularização anormal de tecidos embrionários e redução no número de placentônios (HEYMAN, 2005).

A hidroalantóide, a qual é caracterizada pela presença de acúmulo de fluido no alantóide, promove o aumento dos placentônios e do tamanho fetal. Estudos iniciais indicam que, após a transferência nuclear, 27% das gestações após 120 dias desenvolvem hidroalantóide (OBACK & WELLS, 2003). Tal valor é muito elevado quando comparado em programas de monta ou inseminação artificial (IA) (0,02 a 0,6 %; THIBAUT, 2003).

O elevado peso ao nascimento de crias obtidas pela TNCS caracteriza a síndrome da cria gigante ou LOS (*Large Offspring Syndrome*), a qual foi bem detalhada por YOUNG *et al.* (1998). Esta síndrome foi inicialmente descrita por WILLADSEN *et al.* (1991) em bezerros derivados da transferência nuclear. Quanto às características fenotípicas que identificam esta

síndrome, têm-se: aumento do tamanho fetal, aumento da miogênese fetal e disfunção da atividade pulmonar. Além disso, são verificadas anomalias no desenvolvimento da placenta e redução das taxas de gestação (YOUNG *et al.*, 1998). A LOS é manifestada por tais anomalias fetais que são associadas com as taxas elevadas de perdas gestacionais, particularmente nos primeiros 60 dias da gestação (BERTOLINI & ANDERSON, 2002).

Posteriormente, a ocorrência da LOS foi relatada em embriões produzidos por PIVE (SINCLAIR *et al.*, 2000) e embriões obtidos por TNCS (HILL *et al.*, 2001, KATO *et al.*, 2000). HEYMAN *et al.* (2002) verificaram que 13,3% de bezerros clones são afetados por esta síndrome, a qual pode estar relacionada a alterações nos padrões epigenéticos associados com a cromatina embrionária durante a pré-implantação (REIK & WALTER, 2001; REIK *et al.*, 2003), resultando em alterações na expressão de genes iniciadores e não-iniciadores perturbados pelo uso destas biotécnicas (WRENZYCKI *et al.*, 1998; RIZOS *et al.*, 2003).

1.4. Desenvolvimento das crias nascidas

Em geral, a ocorrência da mortalidade pós-natal é observada da 1ª semana ao 4º mês de vida do animal. Nesse período uma grande variedade de problemas tem sido relatada em clones, incluindo infecções, tais como inflamações do rúmen e abomaso (WELLS *et al.*, 1998), coccidiose e infecções após traumas (HEYMAN *et al.*, 2002). A proporção de bezerros clones nascidos que são viáveis ao desenvolvimento normal até a fase adulta é limitada aos 50-70%, de acordo com vários grupos de pesquisas. CHAVATTE-PALMER *et al.* (2002) verificaram que, de 59 bezerros clones nascidos, 62% destes desenvolveram-se normalmente até a fase adulta.

As características reprodutivas de novilhas clonadas de células somáticas adultas foram avaliadas quanto à puberdade, dinâmica folicular e perfil hormonal, não sendo observada nenhuma alteração quando da comparação com o grupo controle de animais não clonados (ENRIGHT *et al.*, 2002). LANZA *et al.* (2001) demonstraram que novilhas clonadas são férteis, quer seja usando a monta natural ou IA. Usando a técnica de IA, estes autores obtiveram uma taxa de concepção de 83% após a primeira inseminação. Adicionalmente, clones bovinos foram avaliados quanto à libido e à produção quali-quantitativa de sêmen, não sendo verificado nenhum efeito negativo sobre tais parâmetros (HEYMAN *et al.*, 2004).

1.5. Enucleação manual (*Handmade Cloning*)

Desde seus estudos iniciais, a transferência nuclear não sofreu grandes transformações, contudo modificações visando simplificar os protocolos experimentais, a redução de custos, bem como a melhoria da sobrevivência das crias nascidas vêm sendo adotadas por diferentes grupos

de pesquisa. Neste sentido, vários laboratórios vêm adotando a técnica de *Handmade Cloning* (HMC), verificando-se a produção de embriões clones sem a necessidade do uso de micromanipuladores (VAJTA *et al.*, 2003; GERGER *et al.*, 2010). Dentre as vantagens da técnica de enucleação manual quando comparada à técnica clássica, destacam-se: a) o baixo custo, uma vez que não necessitam de micromanipuladores para nenhuma fase da TNCS, b) a simplicidade, a rapidez e a facilidade na execução dos procedimentos e c) a automação da TNCS.

O princípio básico da técnica consiste em promover a digestão da zona pelúcida de oócitos maturados, para, em seguida, com o auxílio de microlâminas, realizar-se a enucleação manual. As interações citoplastos e núcleos doadores ocorrem pela exposição de tais componentes celulares à fitohemaglutinina (VAJTA, 2007). A aplicabilidade deste método já pode ser verificada em diferentes espécies pela produção de embriões clones, tais como a bovina (VAJTA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2009) e ovina (PEURA, 2003).

Estudos têm verificado que as características qualitativas de embriões suínos obtidos por meio da técnica de enucleação manual são similares às daquelas de embriões produzidos por micromanipulação. TECIRLIOGLU *et al.* (2005), comparando a técnica de enucleação manual com a micromanipulação convencional para a produção de clones bovinos, verificaram que tais técnicas apresentam eficiências semelhantes, quanto aos parâmetros de taxa de prenhez, nascimento e sobrevivência das crias. BHOJWANI *et al.* (2005), trabalhando com oócitos bovinos enucleados pela técnica de enucleação manual, verificaram uma taxa de clivagem de 65% e o nascimento de um animal clone.

Assim, de acordo com o exposto, pode ser visto que a TNCS em diferentes espécies de ruminantes tem gerado um forte interesse dos setores científicos e produtivos. Contudo, a eficiência da técnica ainda é baixa devido a inúmeros fatores. Desta maneira, pesquisas ainda necessitam ser realizadas objetivando compreender os diversos eventos envolvidos e integrar alternativas que visem simplificar os protocolos experimentais e reduzir os custos relacionados à técnica. Nesta temática, a HMC apresenta-se como uma ferramenta promissora para a obtenção de tais objetivos.

PARTE II: PAPEL DO OÓCITO NA TÉCNICA DE TNCS

2.1. Maturação *in vitro* (MIV)

Uma das últimas etapas no desenvolvimento de um oócito é a maturação, a qual, exceto em canídeos, se define como o processo em que ocorre a retomada da meiose para logo seguir à

ovulação. A MIV do oócito consiste num procedimento que permite o mesmo maturar *ex vivo*. Esta técnica envolve a remoção artificial de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) de folículos antrais e cultivo desses complexos em condições padrões *in vitro* por 24-28 h, dependendo da espécie, até atingir o estágio de MII. Uma pequena porção desses oócitos maturados apresenta a capacidade de desenvolvimento completo até blastocistos (SCHROEDER *et al.*, 1984).

A eficiência da MIV é limitada pela competência intrínseca do oócito, a qual se refere ao estado molecular e bioquímico que permite o oócito maturado ser fecundado normalmente e desenvolver-se até o estágio de blastocistos, que após transferência permitirá o desenvolvimento até o nascimento das crias (GILCHRIST & THOMPSON, 2007). Uma dos maiores desafios que permanece nas áreas reprodutivas e da biologia do desenvolvimento refere-se a compreender o que constitui a competência de desenvolvimento do oócito, incluindo o papel do ambiente folicular ovariano sobre o oócito. Certamente, as células somáticas dos folículos, em especial as células do *cumulus*, apresentam um papel importante na aquisição da competência de desenvolvimento oocitária *in vivo*. Contudo, informações sobre a natureza e a diversidade dos componentes que são transferidos entre as células do *cumulus* e o oócito, via junções “gap”, durante a fase final de desenvolvimento folicular ainda são pouco conhecidas (ALBERTINI *et al.*, 2001).

No momento da formação do antro e diferenciação das células do *cumulus*, o oócito cresce até seu tamanho definitivo, mas se mantém em Prófase I por intermédio das células foliculares (MEHLMANN, 2005). A indução da maturação envolve a interação de fatores intracelulares, parácrinos e estruturais que incluem esteróides, fatores de crescimento, adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e junções “gap” (GILCHRIST & THOMPSON, 2007).

Nesse contexto, é muito importante também o pico de LH na etapa pré-ovulatória, a qual atua sobre as células da granulosa pelo sinal traduzido dentro do oócito, como uma mudança nas moléculas de sinalização, o que resulta na retomada da meiose (MEHLMANN, 2005). A retomada da meiose se manifesta com a ruptura da membrana da vesícula germinativa, seguida pela condensação dos cromossomos e reorganização do fuso da MI, segregação dos cromossomos homólogos e terminação da primeira divisão meiótica (LIANG *et al.*, 2007).

Em bovinos, por exemplo, observou-se o estado cromossômico a cada momento e determinou-se o tempo estipulado para cada processo do desenvolvimento da maturação (**Tabela 4**) (SIRARD *et al.*, 1989). Após todas as etapas, a meiose para em MII até o momento da fecundação.

Tabela 4. Determinação da duração de cada estado cromossômico a cada momento da meiose na espécie bovina.

Estado cromossômico do oócito	Duração de cada etapa (horas)
Vesícula germinativa	0 até 6,6
Vesícula germinativa rompida	6,6 até 8,0
Condensação dos cromossomos	8,0 até 10,3
Metáfase I	10,3 até 15,4
Anáfase I	15,4 até 16,6
Telófase I	16,6 até 18,0
Metáfase II	18,0 até 24,0

Adaptado de SIRARD *et al.* (1989).

2.1.1. Critérios para identificação de oócitos maturados *in vitro*

Vários critérios são importantes para reconhecer oócitos maturados *in vitro*, como por exemplo: revestimento das células do *cumulus* ao redor da zona pelúcida, zona pelúcida íntegra e ausência de vesículas no citoplasma (RAHMAN *et al.*, 2008). Além disso, o tamanho do oócito é importante para alcançar a maturação (RAJIKIN *et al.*, 1994).

Em bovinos, os folículos com diâmetro maior apresentam oócitos com maior potencial para desenvolvimento embrionário *in vitro* (LONERGAN *et al.*, 2003). O diâmetro do oócito é diretamente proporcional ao diâmetro do folículo e os oócitos continuam a crescer mesmo em folículos com um diâmetro maior que 10 mm (Figura 4).

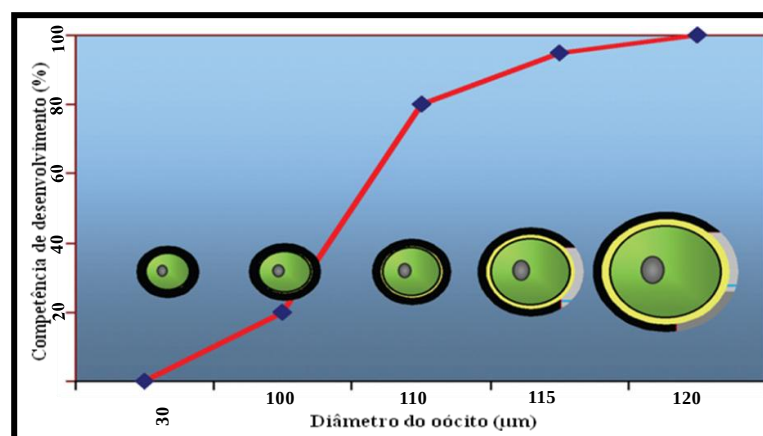


Figura 4. Relação entre competência de desenvolvimento do oócito bovino até o estágio de blastocisto e diâmetro oocitário. Adaptado de GANDOLFI *et al.* (2005).

2.1.1.1. Expansão das células *cumulus* e seu papel na MIV

In vivo, as células do *cumulus* expandem após a ovulação devido à deposição de matriz proteoglicana. O maior carboidrato encontrado na matriz muco-elástica é o ácido hialurônico (SALUSTRI *et al.*, 1999). O papel das células do *cumulus* na aquisição da competência de desenvolvimento dos oócitos tem sido anteriormente investigado (SATO *et al.*, 1977; XU *et al.*, 1986). Tais células são conhecidas por suprir em nutrientes o oócito (HAGHIGHT & VAN WINKLE, 1990), atuar como substrato de energia (SUTTON *et al.*, 2003), apresentar moléculas mensageiras para o desenvolvimento oocitário (BUCCIONE *et al.*, 1990) e medir os efeitos dos hormônios sobre os CCOs (ZUELKE & BRACKETT, 1990).

A morfologia de revestimento das células do *cumulus* ao redor do oócito é comumente utilizada como um critério de seleção antes da MIV (LONERGAN *et al.*, 1994) e o grau de expansão dessas células pode ser usado como um critério de indicação morfológica da qualidade oocitária. Nesse sentido, tem-se sugerido que a expansão das células caracteriza oócitos maturados e de boa qualidade, enquanto a compactação das camadas das células do *cumulus* indica oócitos imaturos (VEECK, 1988).

O processo de expansão das células do *cumulus* é acompanhado pelas modificações nas junções “gap”, as quais contêm canais transmembranas formados por hexâmeros de proteínas pertencentes à família das conexinas (MARCHAL *et al.*, 2003). Embora ainda não observado em caprinos, células do *cumulus* em oócitos bovinos iniciam a expansão após 12 h de incubação *in vitro* quando todos os oócitos já se encontram em MI. O grau de expansão aumenta até as 18 h de incubação e se mantém depois disso (SHAMASUDDIN *et al.*, 1993).

2.1.1.2. Maturação nuclear e citoplasmática

Similarmente ao que ocorre *in vivo*, ambas as maturações, citoplasmática e nuclear, são requeridas para assegurar a fecundação normal e o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Contudo, as mudanças citoplasmáticas durante a maturação oocitária ainda são difíceis de serem avaliadas. Como resultado, a maturação é julgada indiretamente pela estrutura nuclear e/ou pela habilidade do oócito em ser fecundado (RAHMAN *et al.*, 2008).

In vitro, dois grandes eventos estão envolvidos no processo de maturação nuclear. Primeiramente, o CCO é removido da influência do ambiente folicular e segundo, o contato físico com as células da granulosa é rompido, promovendo o fim das comunicações intercelulares via junções “gap”. Esta estimulação físico-química do oócito causa condensação da cromatina e rompimento da vesícula germinativa levando a MII e a segunda retomada artificial do ciclo (EDWARDS, 1965). Contrariamente, oócitos em crescimento não são aptos

para retomar ou completar a meiose. A competência oocitária é adquirida durante a fase de crescimento, quando a síntese e estocagem de proteínas e RNA ocorrem (CROZET *et al.*, 1981).

A competência meiótica é avaliada por uma cascata de eventos induzida pelo pico do LH e pela remoção do oócito do ambiente folicular. Tais eventos são programados para ocorrer mediante a formação do MPF, o qual é uma proteína composta pela ciclina B1 e p34^{cdc2}, este é sintetizada e/ou ativada atuando sobre o oócito que evolui e termina a primeira metáfase e, conseqüentemente, a extrusão do primeiro corpúsculo polar completando a primeira divisão meiótica (SIRARD *et al.*, 2006).

A maturação citoplasmática oocitária inclui os eventos que inserem sobre o oócito uma capacidade a completar a maturação nuclear, fecundação e embriogênese precoce, início da gestação e desenvolvimento fetal normal (SIRARD *et al.*, 2006). A maturação citoplasmática envolve: (a) acúmulo de proteína e RNA mensageiro, (b) desenvolvimento de mecanismos regulatórios de cálcio, (c) mudanças na atividade do MPF, (d) redistribuição das organelas celulares (FERREIRA *et al.*, 2009).

A regulação da maturação citoplasmática não é tão bem conhecida quanto à regulação da maturação nuclear e, conseqüentemente, é um dos fatores limitantes na produção *in vitro* de embriões viáveis a partir de oócitos imaturos (ABEYDEERA, 2002). Um número de critérios tem sido sugerido para avaliar a maturação citoplasmática, tais como: organização do citoesqueleto em oócitos, aumento no número de mitocôndrias e gotas lipídicas, mudanças do arranjo do complexo de Golgi, migração dos grânulos corticais para a periferia, presença de somente o retículo endoplasmático granuloso, atividade do MPF e metabolismo oocitário (RAHMAN *et al.*, 2008).

2.1.2. Regulação do MPF

O MPF é uma cinase envolvida na divisão celular e na regulação do ciclo de transição da célula G2/M de todas as células eucarióticas (GOTTARDI & MINGOTI, 2009). Este fator corresponde a um dos principais reguladores das alterações que ocorrem durante a maturação oocitária, o rompimento do envelope nuclear regulando a condensação dos cromossomos, a reorganização dos microtúbulos e outras organelas citoplasmáticas (KIM *et al.*, 2000; LEFEBVRE *et al.*, 2002).

A ativação do MPF ocorre por um processo de duas etapas que envolvem a formação de um complexo entre a subunidade da cinase (p34^{cdc2} ou CDK1) e uma subunidade regulatória (ciclina B). Uma vez formado, esse complexo por ser ativado pela desfosforilação da treonina 14

e de resíduos da tirosina 15 da subunidade p34. A estabilidade da atividade do MPF pode ser prevenida por agentes químicos que agem nesses dois níveis (MERMILLOD *et al.*, 2000).

Em bovinos, a variação da atividade do MPF pode ser detectada nos oócitos durante a MII. Sua atividade é baixa no estágio de vesícula germinativa, passando a ser observada no início da vesícula germinativa rompida. Em MI alcança um pico e declina sua atividade durante a transição entre os estádios de MI e MII (KUBELKA *et al.*, 2000) e eleva-se novamente para a entrada do oócito em MII (**Figura 5**). A inativação da atividade do MPF ocorre nos oócitos em MII pela fecundação ou ativação partenogenética. Existem evidências de que os oócitos são mantidos em MII por ação de fatores citostáticos (CSF) capazes de manter a atividade elevada do MPF. O CSF é composto de MAPK e c-Mos (Mos cinase), pertencentes à família das serina/treonina cinases (KUBELKA *et al.*, 2000). Essas proteínas são ativadas por sinais extracelulares (KRISCHEK & MEINECKE, 2002). A ampla faixa de atuação das MAPKs é mediada por fatores de crescimento e por soro, com uma ativação menor pelo estresse, pelo efeito osmótico e pela desorganização dos microtúbulos. Assim, também está relacionada à fosforilação de diversos substratos, incluindo fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto. As MAPKs também catalisam a fosforilação e a ativação de diversas proteínas cinases, denominadas de proteínas cinases ativadas pelas MAPKs, que representam um adicional enzimático de vários espectros em diferentes células.

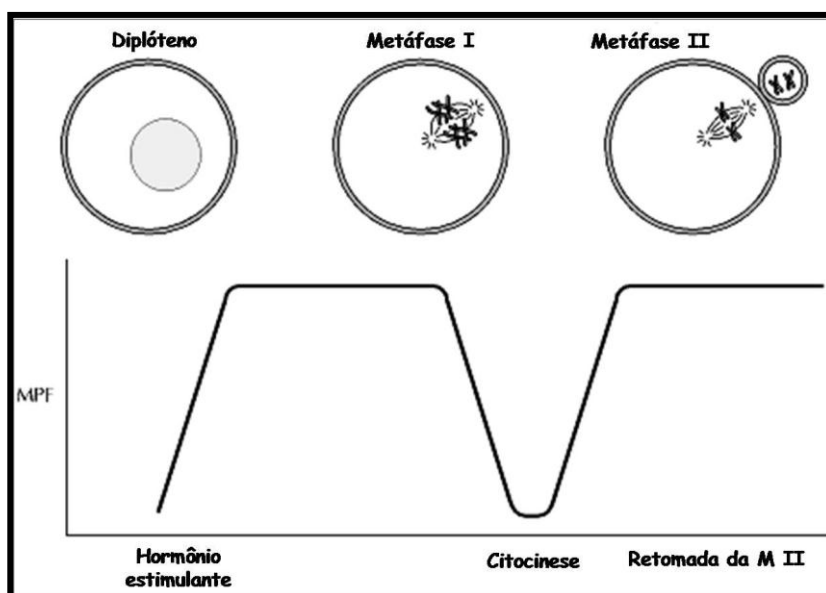


Figura 5. Perfil oscilatório do MPF durante a retomada da meiose e alcance da MII. Adaptado de MAGGWICK & JONES (2007).

2.2. Aspectos moleculares do oócito

De maneira geral, o oócito desenvolve mecanismos para armazenamento da informação adquirida durante as etapas de crescimento folicular e maturação oocitária. Tais informações permanecem guardadas prontas para serem utilizadas em um momento apropriado. A informação armazenada no oócito é particularmente crítica durante o intervalo entre a fecundação e a transição materno-embrionária (TME) quando a atividade transcricional do genoma embrionário torna-se inteiramente funcional (GANDOLFI *et al.*, 2005). Durante este período, o desenvolvimento embrionário é sustentado por ácidos nucleicos maternos e as proteínas são sintetizadas durante a oogênese. A duração desse período depende da espécie. Em mamíferos, a TME pode ocorrer tão precocemente quanto a estágio de 2-células em murinos, ou mais tardiamente em estágio de 4-células em suínos, entre 4- e 8-células em embriões humanos, estágio de 8-células em coelhos e entre 9- e 16-células em embriões ovinos e bovinos (TELFORD *et al.*, 1990).

Em oócitos bovinos, a atividade transcricional do genoma materno tem sido observada já no estágio de folículo secundário. A síntese do RNA nuclear heterogêneo (precursor de RNA mensageiro) e do RNA ribossomal é iniciado durante esse estágio folicular e continua até que o oócito alcance um diâmetro de 110 μm e é encerrada quando o folículo atingir 2 a 3 mm. Esta atividade transcricional fornece estoques de moléculas mensageiras no citoplasma oocitário, a qual será traduzida até, e possivelmente, em TME (FAIR *et al.*, 1997).

Em murinos, aproximadamente 30% do RNA mensageiro materno é ainda detectável no estágio de blastocisto em ambas as regiões: trofotoderma e massa celular interna. Conseqüentemente, a estabilidade do RNA mensageiro materno do oócito é crucial para o desenvolvimento normal, e qualquer dano durante esse processo são prováveis fatores que levam a uma redução da competência de desenvolvimento oocitário e causa um atraso do desenvolvimento embrionário (GANDOLFI *et al.*, 2005).

Vários são os mecanismos de regulação da estocagem de moléculas mensageiras ligadas à transcrição e, posterior, tradução. Os RNAs mensageiros que contém uma cauda poli (A) pequena e são traducionalmente inativos devido a sua baixa estabilidade são ativados pelo aumento da cauda poli (A) à medida que ocorre o desenvolvimento do oócito. Por outro lado, RNA mensageiro estocado em citoplasma de oócitos que não adquiriram competência apresentam a calda poli (A) menor quando comparados àquelas de oócitos competentes (LEQUARRE *et al.*, 2004).

Embora muitos estudos sobre a competência de desenvolvimento oocitário já tenham sido propostos, fatores responsáveis pela qualidade do oócito e sobre sua competência ainda não

foram totalmente esclarecidos. Nesse sentido, as alterações pré-maturacionais que ocorrem por razão da responsividade do folículo à pulsatilidade do LH antes do pico pré-ovulatório são pré-requisitos importantes para o oócito alcançar seu desenvolvimento (ASSEY *et al.*, 1994).

A análise de transcritos específicos como indicador do *status* da expressão gênica total tem sido amplamente observado em oócitos e embriões (WRENZYCKI *et al.*, 2001). O uso de marcadores moleculares na validação da composição de meios tem sido utilizado como uma ferramenta de interesse. Ao longo dos últimos anos, o estudo nessa área tem focado avaliar o efeito dos diferentes meios de maturação sobre a expressão de alguns genes envolvidos na competência oocitária (COTICCHIO *et al.*, 2004; ASSIDI *et al.*, 2008). Dentre esses genes encontram-se a família do EGF (CONTI *et al.*, 2006), principalmente representado pelo Fator de Crescimento Epidermal (EGF) (LONERGAN *et al.*, 1996; GULER *et al.*, 2000) que atua sobre o receptor de EGF (EGFR) (CARPENTER & COHEN, 1990).

O EGF participa na regulação do crescimento oocitário, maturação citoplasmática e nuclear e expansão das células do *cumulus* (GOSPODAROWICZ & BIALECKI, 1979), os quais têm sido relacionados com competência oocitária (DE LA FUENTE *et al.*, 1999; GULER *et al.*, 2000). Contudo, informações do uso de tais marcadores comparando a eficiência de regimes de estimulação são escassas.

Vários estudos têm mostrado que a expressão do EGFR aumenta com a progressão da foliculogênese em virtude da estimulação das gonadotrofinas, atingindo seu máximo no período pré-ovulatório (CHOI *et al.*, 2005). De fato, a estimulação de LH de folículos ovarianos envolve a ativação de um sistema de EGF local (CONTI *et al.*, 2006). Na via de regulação e expressão do EGF no oócito tem identificado LH e FSH. PARK *et al.* (2004) têm mostrado que fatores de crescimento semelhante ao EGF são mediadores parácrinos de sinais de LH durante a ovulação na maturação oocitária. Em geral, o EGF foi considerado um fator promotor de crescimento folicular com efeitos sobre a estereiodogênese regulada por FSH e diferenciação das células da granulosa em folículos pré-antrais (SCHOMBERG *et al.*, 1983). Isto contribuiu para o cenário do FSH como maior orquestrador do crescimento folicular e dos seus efeitos sobre a modulação dos fatores de crescimento, tais como o EGF (ADASHI, 1998).

Em virtude da atividade fisiológica envolvida no processo de maturação, vários grupos têm estudado o EGF no meio de maturação (LONERGAN *et al.*, 1996; DAS *et al.*, 1991) e os resultados mostraram uma ação positiva dessa proteína sobre a expansão das células do *cumulus* e competência meiótica. Em diferentes espécies, inclusive a caprina, EGFR tem sido alvo de estudo. GALL *et al.* (2004; 2005) avaliaram a presença do EGFR em oócitos caprinos e células

foliculares e observaram um possível papel do EGFR sobre a regulação do crescimento folicular e maturação oocitária.

2.3. Importância do oócito para a técnica de TNCS

Em linhas gerais, a clonagem por TNCS envolve a substituição de um núcleo haplóide fecundado por um espermatozóide por um núcleo de uma célula somática e oócito enucleado. O espermatozóide e os eventos da fecundação são substituídos pela fusão da célula diplóide com o citoplasto. Nessa etapa não ocorre apenas uma simples contribuição da metade do material genético, mas uma reprogramação e iniciação do desenvolvimento inicial do embrião. Para o sucesso da TNCS esses eventos necessitam serem melhores conhecidos.

A iniciação do desenvolvimento de embriões reconstruídos, ou ativação oocitária, consiste na retomada da meiose pelo oócito. *In vivo*, após a ovulação e transporte pelo oviduto, os oócitos são fecundados por espermatozóides, os quais causam ativação e retomada da meiose. A finalização da meiose também resulta na descondensação do núcleo espermático e sua transformação no pró-núcleo masculino. O zigoto então progride através do primeiro ciclo celular e inicia uma série de eventos que finaliza no desenvolvimento embrionário (FISSORE *et al.*, 1999). *In vitro*, a ativação e desenvolvimento de oócitos, sem a participação de espermatozóides é denominada de ativação partenogenética. Essa técnica vem sendo cada vez mais empregada, objetivando estudar os mecanismos moleculares do oócito que participam do desenvolvimento embrionário (SUSKO-PARRISH *et al.*, 1994).

A ativação do oócito e a organização dos microtúbulos do aparato do fuso mitótico são eventos intimamente ligados do primeiro ciclo celular e possuem um papel crucial para o início do desenvolvimento. A regulação inapropriada da formação do fuso mitótico e o arranjo dos cromossomos na placa metafásica podem resultar em danos no embrião que podem ser letais se interferirem em pontos chave durante o desenvolvimento (FISSORE *et al.*, 1999).

PARTE III: CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES CLONES

3.1. Efeito das condições *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário

A manipulação de gametas e embriões de animais domésticos resulta em dois caminhos interessantes: a promoção de modificações programadas e esperadas, utilizando meios físicos e químicos e alterações sem intenção através de mudanças ambientais e outros fatores desconhecidos. Esse último caminho, ao longo dessas décadas, tem mostrado uma maior amplitude de ação com conseqüências, às vezes desastrosas, frente à comunidade da ciência

animal. De fato, há vinte anos, não se esperava observar problemas na PIVE como a LOS. Por outro lado, também não se imaginava que uma biotécnica era capaz de gerar uma prole viável a partir do genoma de uma célula somática oriunda de um animal adulto.

A produção de embriões em um cultivo *in vitro* envolve inevitavelmente o suprimento de um sistema que deverá suportar eventos dinâmicos, os quais são sensíveis aos seus fatores circundantes e suscetíveis à vários danos (McEVOY, 2003). Diversos protocolos de PIVE já vêm sendo investigados, contudo, ainda são baseados em uma compreensão incompleta da necessidade do embrião. Entre as espécies domésticas, os ruminantes foram os primeiros que exibiram aberrações no desenvolvimento, indicativo de reprogramação epigenética incompleta ou danos no processo iniciado durante o cultivo *in vitro*.

Para compreender os possíveis efeitos das condições *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário, torna-se interessante conhecer o complexo código genético do desenvolvimento e as modificações epigenéticas contínuas que são cruciais na sua expressão final (McEVOY, 2003). De maneira geral, há vários níveis de composição de um embrião – epigenética, molecular, citoplasmática – e fatores ambientais impróprios impõem danos significativos na integridade e na capacidade de desenvolvimento do zigoto ao blastocisto.

McEVOY *et al.* (2001) têm verificado os efeitos das condições de cultivo *in vitro* sobre o oócito e a expressão gênica. Esses efeitos detectáveis em estádios precoces do desenvolvimento traduzem um maior impacto durante os vários estágios do conceito e do desenvolvimento feto-placentário e mesmo em vida pós-natal. A maioria dos estudos referentes ao tema traz apenas a evidência indireta da expressão gênica alterada, contudo, outros estudos têm buscado mensurar transcritos de genes em tecidos fetais. BLONDIN *et al.* (2000) relataram que níveis de RNA mensageiro de IGF-II no fígado e músculo esquelético de fetos bovinos aos 70º dias oriundos de embriões derivados *in vitro* diferiram daqueles níveis em fetos derivados de embriões *in vivo*. Outro grupo utilizando tecidos do músculo esquelético de fetos bovinos aos 222º dias indicou que RNA mensageiro de miostatina foi menor naqueles fetos derivados de embriões *in vitro* quando comparado a fetos de produção de embriões *in vivo* (CROSIER *et al.*, 2002).

A importante lição aprendida ao longo desses últimos anos de investigação é que os componentes dos meios de cultivo, mesmo amplamente utilizados, não devem ser considerados 100% benéficos ou mesmo benignos para o desenvolvimento do embrião, ao menos que seja provado cuidadosamente grupo a grupo de pesquisa. McEVOY (2003) realizando comparações de diferentes fontes de soro revelou efeitos críticos sobre a sobrevivência embrionária em curto prazo. As modificações epigenéticas de um ou vários genes influenciam a vitalidade e o tamanho do feto e podem conduzir a uma variedade de aberrações resultantes de danos derivados do

cultivo *in vitro* (SINCLAIR *et al.*, 2000). Certamente, a intolerância pode ser maior conduzindo às falhas no desenvolvimento imediato quando as circunstâncias são sub-ótimas.

Durante a última década, têm-se observado uma ascensão exponencial no número de estudos sobre a tecnologia de TNCS em rebanhos de animais domésticos e outros mamíferos. Mesmo com a morte de Dolly, não inverteu a inclinação em gerar prole a partir da fusão de citoplastos enucleados com carioplastos geneticamente transformados (transgênicos) ou não-transgênicos. Muitos desses esforços, contudo, continuam a encontrar limitações de desenvolvimento associadas com os embriões reconstruídos que após sobreviverem aos traumas de enucleação oocitária e fusão de complexos citoplasto-carioplasto encontra-se com as condições de cultivo *in vitro*.

A fim de procurar conhecer as limitações, diferentes grupos buscam comparar aproximações convencionais que podem ser eficazes e, conseqüentemente, ajudar a eliminar os danos associados com a TNCS. GAVIN *et al.* (2003) encontraram melhores taxas de sobrevivência de embriões caprinos reconstruídos derivados de TNCS de células fetais transfectadas, quando luz polarizada foi empregada ao invés da luz UV nas etapas de enucleação oocitária. Em embriões suínos produzidos por transferência nuclear seguida de eletrofusão ou injeção intracitoplasmática (NAGASHIMA *et al.*, 2003), os autores verificaram rendimentos maiores (expressos como percentual de embriões reconstruídos por cultivados) nos embriões derivados do protocolo de eletrofusão.

Na mesma temática, as informações sobre o controle de doadores de oócitos e nutrição devem ser benéficos (PEURA *et al.*, 2003). Contudo, talvez os passos mais dramáticos possam ser realizados modificando as condições *in vitro* de cultivo associada geralmente com esses procedimentos. Isto porque com a dependência inevitável do cultivo *in vitro* e soro, embriões derivados de TNCS são expostos não somente aos traumatismos da enucleação, eletrofusão e reconstrução embrionária, mas igualmente as perturbações que podem infligir na LOS em embriões menos competentes. O desafio em conhecer e talvez eliminar os efeitos gerados pelas condições *in vitro* consiste em modificar as condições artificiais de modo a evitar resultados prejudiciais e a planejar os métodos de detecção que identificam com confiança o genótipo das aberrações antes da transferência de embriões (McEVOY, 2003).

Além disso, a identificação de falhas no início do desenvolvimento embrionário facilitaria extremamente a compreensão das origens das limitações placentárias, por exemplo. Adicionalmente, a disponibilidade de marcadores confirmativos ou preventivos, aceleraria os estudos visando meios de cultivo adequados que combinem perfeitamente a necessidade nutricional e de crescimento dos embriões *in vitro*.

3.2. Danos ao DNA gerados pelas condições artificiais e mecanismos de reparo do material genético envolvendo γ H2A.X

A estrutura primária do DNA é constantemente sujeita a alterações por metabólitos e agentes exógenos danosos ao material genético. Essas alterações podem causar simples alterações ou mudanças complexas incluindo deleções, fusões, translocações ou aneuploidias (SANCAR *et al.*, 2004). Tais alterações podem levar à morte celular de organismos unicelulares ou modificações degenerativas em organismos multicelulares.

Os danos ao DNA podem perturbar a homeostasia celular e ativar ou amplificar as vias bioquímicas que regulam o crescimento e divisão das células e vias que ajudam a coordenar a replicação do DNA com remoção dos danos. Os quatro tipos de vias resultantes do dano ao DNA são: a) reparo do DNA; b) “checkpoints” dos danos de DNA; c) resposta transcricional e d) apoptose (ZHOU & ELLEDGE, 2000).

Os embriões produzidos por manipulação *in vitro*, independente de apresentarem ou não transgenia, apresentam danos no DNA ocasionados pela exposição às condições artificiais. As possíveis fontes causadoras desses danos podem ser de origem exógena, como exposição à irradiação e aos agentes químicos, ou endógena, como metabólitos reativos e erros durante a replicação do DNA (HOEIJMAKERS, 2001). Vários estudos demonstraram um atraso durante o processo de desenvolvimento em embriões precoces de mamíferos cultivados *in vitro* quando comparados aos embriões *in vivo*. Um dos fatores ambientais que podem contribuir a diferenças de desenvolvimento é, por exemplo, a concentração de oxigênio. *In vivo*, as concentrações de oxigênio no ambiente ovidutário e uterino são abaixo daquelas utilizadas convencionalmente em cultivo de embriões *in vitro* (MASS *et al.*, 1976). O estresse oxidativo sob altas concentrações é correlacionado com a geração de espécies de oxigênio reativo, tais como o peróxido de hidrogênio que induz fragmentação no DNA em células (HALLIWELL & ARUOMA, 1991), além de danos na membrana celular (AITKEN *et al.*, 1989). Além disso, o aumento nos danos de DNA apresenta uma correlação positiva na redução do potencial de desenvolvimento de embriões e, provavelmente, um fator que contribui para a restrição do desenvolvimento (TAKAHASHI *et al.*, 1999).

As respostas aos danos do DNA são necessariamente importantes para assegurar a transmissão de informação genética intacta. A forma fosforilada da H2A.X, denominada γ H2A.X, tem recebido atenção em virtude da sua relação com danos gerados ao DNA, particularmente as DSBs (“Double Strand Breaks”) (REDON *et al.*, 2002; PILCH *et al.*, 2003). Nesses estudos, demonstrou-se que dentro de poucos minutos de exposição à radiação ionizante ou outros fatores exógenos a uma célula, já se induz DSBs e H2A.X é fosforilada por membros

da família fosfatidil-inositol 3-quinase (PI-3K), resultando em formas localizadas, denominadas de *foci*, que ocorrem nas vizinhanças dos sítios DSBs (ROGAKOU *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2005) (**Figura 6A**).

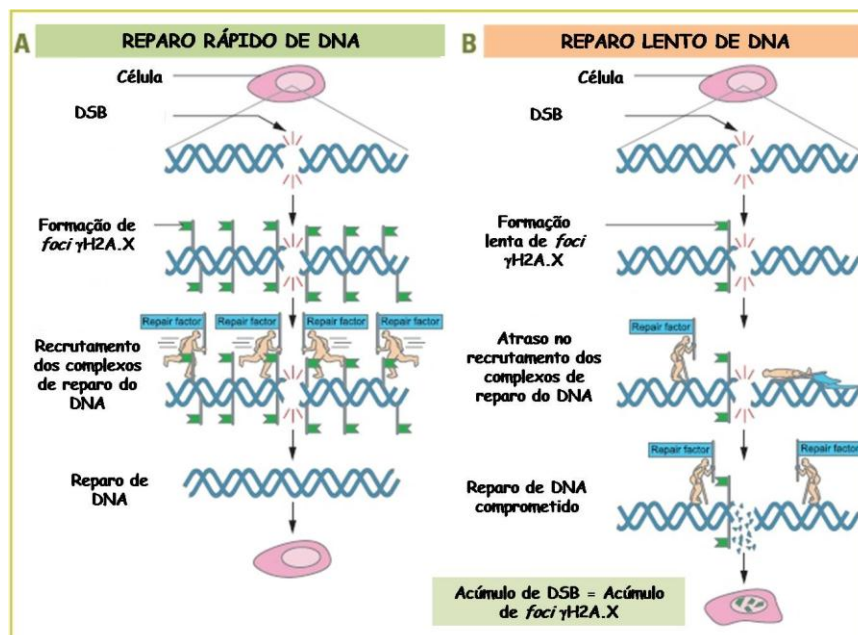


Figura 6. Formação dos *foci* de γ H2A.X seguida de reparo do DNA. **(A).** Reparo rápido de DNA e **(B).** Reparo lento de DNA. Adaptado de SEDELNIKOVA *et al.* (2008).

Além disso, a H2A.X possui um papel essencial no recrutamento e acúmulo de proteínas de reparo do DNA (FERNANDEZ-CAPETILLO *et al.*, 2003, FILLINGHAM *et al.*, 2006). Por outro lado, quando o reconhecimento desses locais danificados é lento, ocorre um atraso no recrutamento dos complexos de reparo e, conseqüentemente, um comprometimento do reparo que culmina no acúmulo de danos e aumento de *foci* de γ H2A.X (**Figura 6B**).

Desta maneira, a formação de *foci* de histona H2A.X fosforilada é utilizada como um marcador de danos do DNA e consiste em um “checkpoint” da célula em resposta ao dano no material genético. A H2A.X é uma variação da H2A e constitui de 2-25% das histona H2A de mamíferos de acordo com o organismo e tipo de célula (ROGAKOU *et al.*, 1998; REDON *et al.*, 2002). O DNA de eucariotos é empacotado ao redor de um octâmero de quatro proteínas de histona no núcleo, sendo duas moléculas de cada grupo (H4, H3, H2A e H2B) formando o nucleossomo (**Figura 7**). As histonas são alvos essenciais para a regulação dos processos de DNA que incluem a transcrição, a replicação e reparo do DNA. Entre as histonas nucleares, a H2A apresenta o número mais elevado de variações, e algumas dessas variações com funções

específicas durante a espermatogênese e desenvolvimento pré-implatacional (FAAST *et al.*, 2001; GOVIN *et al.*, 2007).

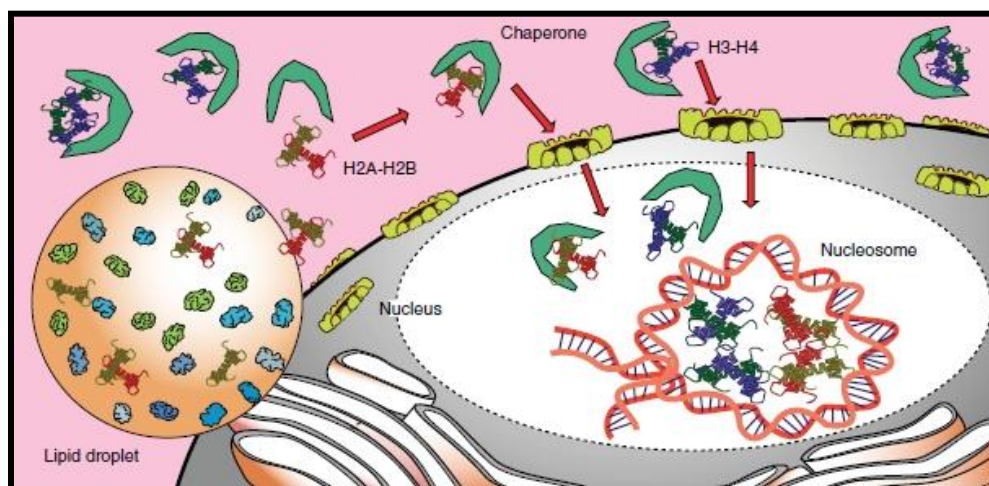


Figura 7. Empacotamento da cromatina em eucariotos. Gotas lipídicas em embriões de *Drosophila* são utilizadas como depósitos para as histonas H2A e H2B. Tais histonas são liberadas dessas gotas lipídicas e transportadas dentro do núcleo por proteínas denominadas chaperonas. Dentro do núcleo, tetrâmeros de H3 e H4 encontram-se envolvidos por DNA genômico, seguida pela associação com os dois dímeros de H2A e H2B. O resultado é o nucleossomo, a unidade básica de empacotamento da cromatina. Adaptado de BRASAEMLE & HANSEN (2006).

A H2A.X apresenta uma região conservada de Ser-Glu no grupamento carboxil terminal da proteína e a serina 139 dessa região é rapidamente fosforilada pela ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) dentro de minutos após o dano no material genético (ROGAKOU *et al.*, 1998; REDON *et al.*, 2002). Assim, a fosforilação da H2A.X atua tanto como um sensor de danos ao DNA como um amplificador de sinais exigidos para impedir a célula com DNA danificado de iniciar a cariocinese (ZIEGLE-BIRLING *et al.*, 2009). Numerosos estudos têm demonstrado a utilização da γ H2A.X como biomarcador de danos no material genético, como por exemplo em células teciduais irradiadas (ROGAKOU *et al.*, 1998), células embrionárias irradiadas (ADIGA *et al.*, 2007) e embriões submetidos a estresse ambiental (ZIEGLE-BIRLING *et al.*, 2009). As respostas a diferentes danos ao material genético são ativadas durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Contudo, os mecanismos e os processos envolvidos nesse reparo, principalmente quando da inserção de um transgene ao genoma, ainda não são completamente conhecidos.

3. JUSTIFICATIVA

A biotécnica de TNCS apresenta uma série de aplicações com diferentes objetivos, tais como a produção de animais transgênicos, conservação de recursos genéticos e estudos na compreensão da interação núcleo-citoplasma durante a reprogramação celular. Embora a TNCS tenha alcançado um forte interesse para a obtenção de animais superiores e indivíduos transgênicos, esta ainda apresenta uma baixa eficiência quando comparada a outras biotecnologias.

O sucesso da técnica de TNCS varia entre 1 % a 83% nos estudos já realizados. Isso acontece em virtude de uma variedade de fatores, tais como o tipo de célula doadora, o método de cultivo embrionário, as falhas da reprogramação celular, a variação entre laboratórios e as metodologias empregadas para as etapas de enucleação oocitária e reconstrução embrionária, além da fonte e qualidade do oócito ao início da maturação. Nesse sentido, investigar os aspectos moleculares relacionados ao oócito e detectar possíveis danos ao material genético gerados pelas condições *in vitro* representam alicerces relevantes para incrementar a eficiência da técnica.

Desta maneira, a avaliação da expressão de genes relacionados à competência de oócitos a serem utilizados nas etapas posteriores da TNCS torna-se de suma importância para o desenvolvimento da técnica de TNCS em caprinos. Por outro lado, investigar por meio da fosforilação da H2A.X (γ H2A.X) danos ao DNA poderão trazer informações relevantes para assegurar a transmissão da mensagem genética intacta. E, finalmente, a produção e estabelecimento de prenhez de embriões clones transgênicos produzidos pelo método HMC poderá possibilitar a aplicabilidade desse método na espécie caprina, já comprovado em bovinos.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

4.1. CAPÍTULO I

O tipo de regime hormonal de estimulação ovariana utilizando FSH e eCG afeta a taxa de maturação *in vitro* e níveis de expressão de EGF e EGFR em oócitos e células do *cumulus* recuperados por laparoscopia em cabras.

4.2. CAPÍTULO II

Embriões bovinos produzidos por TNCS apresentam um maior número de *foci* de γ H2A.X em resposta aos danos ao material genético gerados durante as etapas de reconstrução embrionária e detectáveis no desenvolvimento *in vitro* quando comparados à embriões derivados de ativação partenogenética e FIV.

4.2. CAPÍTULO III

Embriões caprinos clones transgênicos viáveis podem ser produzidos em taxas aceitáveis utilizando a técnica de TNCS pelo método HMC.

5. OBJETIVOS

5.1. GERAL

Avaliar distintos fatores técnicos e biológicos que podem contribuir para o sucesso da TNCS em ruminantes.

5.2. ESPECÍFICOS

5.2.1. CAPÍTULO I

- Comparar o nível de expressão de EGF e EGFR em oócitos e células do *cumulus* quanto ao tipo de tratamento de estimulação ovariana (padrão vs. one-shot), qualidade oocitária (GI/GII vs. GIII) e maturação nuclear (imaturo vs. maturado vs. não maturado);

5.2.2. CAPÍTULO II

- Detectar quantitativamente a presença da γ H2A.X em embriões bovinos produzidos *in vitro* quanto ao tipo de técnica de obtenção de embriões (TNCS vs. ativação partenogenética vs. FIV) e estágio embrionário (uma célula ou zigoto vs. duas células vs. blastocisto);

5.2.3. CAPÍTULO III

- Produzir embriões caprinos clones transgênicos para o hG-CSF utilizando o método de TNCS por HMC;
- Determinar a taxa de prenhez usando embriões caprinos transgênicos produzidos por HMC.

6. CAPÍTULO I

GOAT OOCYTE PRODUCTION BY STANDARD OR ONE-SHOT FSH TREATMENTS AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF TRANSCRIPTS FOR EGF LIGAND AND ITS RECEPTOR AFTER *IN VITRO* MATURATION

PRODUÇÃO DE OÓCITOS CAPRINOS UTILIZANDO TRATAMENTOS PADRÃO E DOSE ÚNICA DE FSH E ANÁLISE QUANTITATIVA DE TRANSCRITOS PARA O LIGANTE EGF E SEU RECEPTOR APÓS A MATURAÇÃO *IN VITRO*

Periódico: Reproduction, Fertility and Development.

Fator de Impacto: 2.379.

(Em processo de submissão)

Goat oocyte production by standard or one-shot FSH treatments and quantitative analysis of transcripts for EGF ligand and its receptor after *in vitro* maturation

A. F. Pereira, A. S. Alcântara Neto, E. S. Albuquerque, M. C. S. Luciano, D.I.A. Teixeira, V. J. F. Freitas and L. M. Melo^A

Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, School of Veterinary Medicine, Ceará State University, Av. Dedé Brasil 1700, Fortaleza-CE, Brazil.

^ACorresponding author. Email: lucianamelo.uece@gmail.com

Author for correspondence: Luciana Magalhães Melo

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução

Universidade Estadual do Ceará/Faculdade de Veterinária

Av. Dedé Brasil 1700, Fortaleza-CE, Brasil

Tel: +55 85 31019861

Fax: +55 85 31019840

Email address: lucianamelo.2005@gmail.com

Running headline: Oocyte production in goats

ABSTRACT

We investigated the expression of EGF and its receptor (EGFR) in oocytes and *cumulus* cells from goat COCs recovered by LOR after standard (multi-dose FSH) or one-shot (single dose FSH plus eCG) treatments for ovarian stimulation. In both protocols, no difference was observed in the number of recovered oocytes per animal (11.7 ± 4.9 vs. 10.8 ± 4.3), percentage of recovered GI/GII and GIII COCs (73.9% vs. 70.1% and 14.2% vs. 16.8%) and nuclear maturation rate (49.1% vs. 46.1%) between standard and one-shot regimes, respectively ($P > 0.05$). On the other hand, the COCs obtained from the two treatments were somewhat different at the molecular level. In spite of the very low EGF expression levels, transcripts could be detected in goat oocytes and *cumulus* cells. While EGFR expression differed ($P < 0.05$) in *cumulus* cells from COCs produced from the two hormonal treatments, no quantitative differences ($P > 0.05$) were measured in oocytes. Concerning IVM, only for standard hormonal treatment the expression of EGF was up-regulated ($P < 0.05$) in MII oocytes relative to immature or non-competent oocytes.

In *cumulus* cells, the EGFR transcripts increased during IVM, but the level remained lower in one-shot-derived structures than in comparison with standard protocol ones. In conclusion, COCs produced by both treatments were somewhat different concerning to EGF and EGFR gene expressions. However, such differences could not be correlated with developmental competence, at least until the maturation step. Interestingly, the *in vitro* maturation strikingly increased the EGFR expression in both oocytes and *cumulus* cells. These findings seem to be strongly correlated with the resumption of the meiosis, and point out to an action through the *cumulus* cells or directly on the oocyte receptor.

Additional keywords: gonadotropins, gene transcripts.

INTRODUCTION

In vitro embryo production (IVP) and related technologies, such as Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT), have been used in goats mainly to multiply breeds and genetic lines, for animal cloning and transgenesis (Tervit 1996; Baldassare *et al.* 2002). Thus, it is very important to provide a large number of *in vitro*-matured oocytes either to IVP or to make available cytoplasts for goat cloning. Laparoscopic oocyte recovery (LOR) has been shown to be a useful tool to provide good quality and numbers of *cumulus*-oocyte complexes (COCs) in goats available for different biotechnologies (Baldassarre *et al.* 1994), such as for the generation of transgenic goats (Baldassarre *et al.* 2003).

In the last years, our group obtained transgenic goats (Freitas *et al.* 2007, 2010) using a naturalized breed, named Canindé. From now on, we intend to multiply the female transgenic founder using IVP and SCNT. To achieve these goals, the laboratory is working with LOR in Canindé goats submitted to hormonal treatments for ovarian stimulation. LOR has the potential to be performed during a long period of the year (Baldassare *et al.* 2002) without affecting the reproductive potential of donors (Stangl *et al.* 1999).

To a wider application of IVP embryo technology is important to simplify the procedures involved, especially those concerning hormonal treatments before LOR, without reduction of oocyte quality (or developmental competence). A number of variables has been associated with developmental competence. *In vivo* acquisition of oocyte developmental competence occurs continuously throughout folliculogenesis and is influenced by several factors during oogenesis, such as the nutritional status (Webb *et al.* 2004) and the hormonal treatment protocol (Cocero *et al.* 2010). In addition, the hypothesis that the quality of the stockpiled mRNA in the matured

oocyte will dictate developmental competency is largely accepted (Sirard, 2001; Dieleman *et al.* 2002; Rizos *et al.* 2002; Fair *et al.* 2004). Moreover, the composition of the *in vitro* maturation media will also provide the oocyte with certain factors that may contribute to the acquisition of developmental competence (Ali and Sirard 2002).

It is now generally recognized that the control of ovarian function involves not only gonadotropins but also various local paracrine and autocrine factors that form a complex communication network within the ovarian follicle (Hunter *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2009). Among numerous ovarian factors reported, members of the Epidermal Growth Factor (EGF) family have received increasing attention in recent years, especially their roles in mediating *in vivo* final oocyte maturation and ovulation (Park *et al.* 2004) and IVM in several mammals (Lonergan *et al.* 1996; Guler *et al.* 2000; Uhm *et al.* 2010) including the goat (Cognié *et al.* 2002). EGF is a member of a large family of closely related proteins that includes amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG), betacellulin (BTC), and transforming growth factor- α (TGF- α). All of these EGF-like ligands use the same EGF receptor, EGFR (Shimada *et al.* 2006).

Recently, our group reported the oocyte production in goats raised in Northeast Brazil, using two FSH protocols for ovarian stimulation (five vs. three injections). The use of the protocol with higher number of FSH injections resulted in COCs with greater oocyte meiotic competence and higher levels of EGF receptor (EGFR) expression in *cumulus* cells when compared to the treatment with fewer number of doses (Almeida *et al.* 2010). We also reported an increased EGFR expression in goat COCs after IVM, which seemed to be strongly associated with the resumption of meiosis (Almeida *et al.* 2010).

In the present work, we evaluate another alternative gonadotrophic protocol (one-shot of FSH plus eCG) for goat ovarian stimulation, comparing it to the conventional hormonal regime with FSH multi-doses, in order to produce COCs based on LOR. We examined the COC yield according to morphological evaluation of the structures, the rate of nuclear IVM and the expression of EGF and its receptor (EGFR) in oocytes and *cumulus* cells before and after IVM.

MATERIALS AND METHODS

Animal ethics and management

All the procedures used in the present study were performed in a compliance with the guidelines from the animal care, according to Van Zutphen and Balls (1997). A total of 18 adult goats (mean body weight $\pm$ SEM, 32.9 ± 0.5 kg) were selected as oocyte donors. All animals were housed indoors in groups of five per pen under controlled nutrition, with access to Tifton

(*Cynodon dactylon*) pasture at morning and receiving Tifton during the afternoon. Additionally, goats were feed with good-quality concentrate (20% crude protein), water and mineral blocks *ad libitum*.

Hormone treatments

The animals were submitted to two ovarian stimulation protocols. Thus, each treatment was performed in three sessions, with the use of five to six different animals per session per protocol. Females were synchronized by means of intravaginal sponges impregnated with 60 mg medroxyprogesterone acetate (Progespon; Syntex, Buenos Aires, Argentina) inserted for 11 days and with a luteolytic injection of 50 µg cloprostenol (Ciosin; Coopers, São Paulo, Brazil) in the 8th day of treatment. The standard ovarian stimulation was carried out using 120 mg pFSH (Folltropin-V; Vetrepfarm, Ontario, Canada) distributed in five injections (30/30; 20/20; 20 mg) at 12 intervals started in 8th day of progestagen treatment. The one-shot treatment used 70 mg pFSH plus a single dose of 200 IU eCG (Novormon; Syntex, Buenos Aires, Argentina) administered 36 h before sponge removal.

Anesthesia and oocyte recovery

Ovarian follicles were punctured just after the sponge removal using LOR procedures, as previously described by Baldassarre *et al.* (2003). In brief, goats were starved of food 36 h and of water 24 h prior to LOR. LOR was performed under anesthesia with 0.5 mg/10 kg of xilazin hydrochloride (Coopazine 2%; Coopers, São Paulo, Brazil) and 25 mg/10 kg of ketamine hydrochloride (Ketamine; União Química, São Paulo, Brazil). Oocytes were aspirated from follicles >2 mm in diameter, visible on the ovaries surface, using a 22- gauge needle (Watanabe, São Paulo, Brazil) and a vacuum pump (Biosystem, Biocom, São Paulo, Brazil). The vacuum pressure was regulated to -30 mmHg, generating a fluid flow of 7–7.5 mL/min. The collection medium used was TCM199 (Nutricell, Campinas, Brazil) buffered with 10 mM HEPES and supplemented 20 UI/mL heparin and 40 µg/mL gentamin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Assessment of oocyte quality and IVM

Cumulus-oocyte complexes (COCs) from each ovarian stimulation protocol were selected under a stereomicroscope and graded in GI to GIV based on *cumulus* cells and homogeneous cytoplasm as described by Almeida *et al.* (2010). Thus, GI COCs were multilayered compact *cumulus* cells and finely granulated oocyte cytoplasm, GII structures has one to three layers of

cumulus cells and finely granulated oocyte cytoplasm and GIII COCs has incomplete or no cellular vestment or heterogeneous oocyte cytoplasm. GIV COCs with abnormal shape and heterogeneous oocyte cytoplasm or apoptotic oocytes in jelly-like *cumulus*-corona cells vestment.

For IVM, GI and GII COCs of each stimulation protocol were washed four times and incubated in 500 μ L maturation medium in four-well dishes. The maturation medium was TCM199 (Nutricell, Campinas, Brazil) buffered with 10 mM HEPES containing 10 ng/mL EGF, 100 μ M cysteamine and 40 μ g/mL gentamicin sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The IVM conditions were 5.0% CO₂ in humidified air at 38.5°C for 24 h. To evaluate the maturation, *cumulus* cells were removed from all oocytes by repeated pipetting. Mature oocytes (MII) were evaluated by visualizing the first polar body and no apparent sign of degeneration, whereas oocytes with no visible polar bodies were classified as non-competent (NC).

Collection of experimental sampling

Samples of pooled immature GI, GII and GIII COCs (Pre-IVM) and MII and NC oocytes (Post-IVM) were collected separately for further RT-qPCR analyses, according to Almeida *et al.* (2010). Briefly, pool of 10 denuded oocytes and *cumulus* cells from 10 denuded COCs were pooled separately in individual tubes, quickly spun and snap-frozen to be stored -80°C until RNA extraction. Denuded GIII and GIV COCs were discarded. In the case MII and NC COCs, *cumulus* cells from 10 denuded COCs (from both MII and NC COCs, as *cumulus* cells removal was prior to oocyte screening) were pooled in individual tubes. In all the cases, COCs were obtained of three sessions per protocol of ovarian stimulation.

RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR amplification

Total RNA extraction was prepared from pooled oocytes or *cumulus* cells obtained from GI/GII and GIII immature CCOs and MII and NC COCs using RNeasy micro kit (Qiagen Inc., Valencia, USA) according to the manufacturer's instructions. In brief, each frozen sample were incubated in 75 μ L of RLT Plus buffer and mixed with an equal volume of 70% ethanol. The mixture was then transferred to an RNeasy MinElute spin column from the RNeasy Micro kit for RNA to bind to the column. RNA purification included an RNase-free DNase treatment for 15 min at room temperature. After three washes, the RNA was eluted with 12 μ L RNase-free water.

Reverse transcription was achieved by adding the following to each RNA sample: 20 μ M oligo-dT primer (Promega, Madison, USA); 1 μ L of Improm II (Promega, Madison, USA); 0.5 mM of each dNTP (Promega, Madison, USA); 2 U/ μ L of RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad,

USA), and RNase-free water to make a final reaction volume of 20 μ L. Reactions were heated to 70°C for 5 min and then placed in to ice. Then, reverse transcription was performed at 42°C for 60 min, followed by 70°C for 15 min. The first strand cDNA products were then stored at -20°C for later use as template for qRT-PCR. Negative controls or RT blanks were prepared under the same conditions, but without inclusion of reverse transcriptase.

Relative quantification was performed in triplicates for EGF, EGFR and GAPDH genes using a MasterCycler ep Realplex (Eppendorf Realplex 4s, Hamburg, Germany) and reactions using a mixture of 20 μ L total volume containing 10 μ L 2x FastStart Universal SYBR Green PCR Master (Roche, Mannheim, Germany), 0.2 μ M of each primer (Table 1) and 1 μ L cDNA. Template cDNA was denatured at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of an amplification program of 95 °C for 15 s, 55°C for 15 s and 60 °C for 30 s. Fluorescence data was acquired during the 72 °C extension steps. Specificity of each reaction was ascertained after completion of the amplification protocol. After each PCR run from each cell type (oocytes or *cumulus* cells), a melting curve analysis was performed for each sample to confirm if a single specific product was generated. Negative controls, comprised of the PCR reaction mix without nucleic acid, were also run with each group of samples.

Data and statistical analysis

Mean number of COCs recovered per animal of the two hormonal treatments were compared using the *t* test for non-paired samples. A value of $P < 0.05$ was set as the limit of statistical significance. The percentage of graded COCs and maturation rates were analyzed using the Fisher's exact test. The program used for the statistical analysis was GraphPad InStat 3.06 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). The relative quantification of the expression of gene was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001). Target gene expression was normalized against GAPDH transcript levels (Goossens *et al.* 2005). Threshold and C_t (threshold cycle) values were automatically determined by Realplex 2.2 software (Eppendorf, Hamburg, Germany), using default parameters. The T_m (melting temperature) data was expressed as mean $\pm$ SD of three or more measurements and was compared using one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison test, and were determined to be significant when $p < 0.05$.

RESULTS

The total number of LOR-derived COCs produced in goat after one-shot (70 mg of FSH plus 200 UI of eCG, each administered in single doses) gonadotrophic protocol for ovarian stimulation was not different ($P>0.05$) from that obtained by standard treatment (120 mg of FSH, administered in multi-doses), as shown in Table 2. Additionally, the percentages structures morphologically classified as GI, GII and GIII were also equivalent ($P>0.05$). GI and GII COCs were selected for *in vitro* maturation and after removal of *cumulus* cells the percentages of metaphase II oocytes (IVM rate) were calculated. No differences between IVM rates ($P>0.05$) were observed among the treatments.

Concerning to quantitative RT-PCR analysis (RT-qPCR), both EGF and EGFR transcripts, as well as GAPDH, were detected in goat oocytes (Fig. 1A and 1B) and *cumulus* cells (Fig. 1C and 1D). The melting temperature (mean $\pm$ SD) of the amplicons produced in oocytes did not differ ($P>0.05$) from that in *cumulus* cells, for EGF ($76.58^{\circ}\text{C} \pm 0.26$ vs. $76.62^{\circ}\text{C} \pm 0.27$), for EGFR ($77.95^{\circ}\text{C} \pm 0.20$ vs. $78.12^{\circ}\text{C} \pm 0.21$) and for GAPDH ($81.07^{\circ}\text{C} \pm 0.21$ vs. $80.67^{\circ}\text{C} \pm 0.49$). No amplification was observed for the samples without reverse transcriptase enzyme (negative controls).

In spite of the very low EGF expression levels, transcripts were detected in goat oocytes and *cumulus* cells, obtained from all experimental conditions (Fig. 2 and Fig. 3). Additionally, the receptor (EGFR) mRNA was also extensively detected and was more abundant than the ligand (Fig. 2 and Fig. 3). Furthermore, the EGF transcript levels were equal ($P>0.05$) in GI/GII and GIII structures independently of the gonadotropic protocol used (Fig. 2A). While EGFR expression differed ($P<0.05$) among *cumulus* cells from COCs produced from the two hormonal treatments (Fig. 2B), no quantitative differences ($P>0.05$) were measured in oocytes (Fig. 2A). Thus, *cumulus* cells have higher EGFR mRNA levels in standard protocol-derived COCs than in one-shot and in GI/GII structures compared to GIII.

Concerning IVM, EGFR transcripts have strikingly risen ($P>0.05$) in metaphase II oocytes and their *cumulus* cells in both gonadotrophic treatments (Fig. 3A and Fig. 3B). The receptor expression levels were similar between immature and non-competent oocytes, for the two hormonal protocols (Fig. 3A). In *cumulus* cells, the EGFR transcripts increased during IVM, but the level remained lower in one-shot-derived structures in comparison to standard protocol (Fig. 3B). Finally, the EGF mRNA quantity was identical in *cumulus* cells prior to and following IVM process (Fig. 3B). Only for standard hormonal treatment, the expression of this growth factor significantly improved ($P<0.05$) in MII oocytes relative to immature or non-competent oocytes, which were equivalent between one another (Fig. 3A). Intriguingly, this increase during IVM was not observed in one-shot-derived oocytes ($P>0.05$).

DISCUSSION

The success of embryo IVP technologies depends of multiple steps and each of these may influence the successful outcome. Studies have shown that the initial events, such as *in vivo* follicular development and *in vitro* oocyte maturation, are important for embryonic development, embryo survival, pregnancy and kidding rates obtained with IVP embryos (Dieleman *et al.* 2002). In this sense, hormonal treatment for ovarian stimulation can affect the success of *in vitro* embryo production by mRNA transcripts regulation in recovered COCs. In the present work, parallel to the morphological classification and IVM rate analysis, we investigated the expression of EGF and its receptor (EGFR) in oocytes and *cumulus* cells from goats COCs recovered by LOR after standard (multi-dose FSH) or one-shot (single dose FSH plus eCG) treatments for ovarian stimulation. No differences were observed among the number of recovered and morphologically graded COCs and IVM rates for both gonadotrophic treatments. Originally, the one-shot protocol was applied in sheep by Baldassarre *et al.* (1996) and these authors reported oocyte and embryo production equivalent to the standard procedure. Since then, this group has used the simplest protocol in several sheep and goat breeds, under various physiological conditions (Baldassarre *et al.* 2002). Even preliminary, the present work indicates that one-shot gonadotrophic regimen can be used as efficiently as the standard treatment for production of LOR-derived oocytes from Canindé goats raised in the Northeast Brazil.

On the other hand, the COCs obtained from the two treatments were somewhat different at the molecular level. While the EGF transcript levels were equal in both oocytes and *cumulus* cells, the EGFR expression differed among the *cumulus* cells, but not in oocytes. Thus, *cumulus* cells have higher EGFR mRNA levels in standard protocol-derived COCs than in one-shot treatment. Previously, our group found that the use of a protocol with higher number of FSH injections at a shorter interval resulted in COCs with a higher level of EGFR expression in *cumulus* cells (Almeida *et al.* 2010). Through the use of real-time PCR, transcript levels of selected target genes in COCs have been compared in growing follicles (Mourot *et al.* 2006; Racedo *et al.* 2008). Choi *et al.* (2005) demonstrated that the EGFR expression increases with progression of folliculogenesis due to gonadotrophic stimulation, reaching its maximum at the preovulatory stage.

Traditionally, the morphological criteria have been used to select good quality COCs for *in vitro* production of embryos and related technologies, such as somatic cell nuclear transfer. Oocytes with a compact *cumulus* composed of several layers of cells and a homogeneous cytoplasm are considered healthy (Baldassarre *et al.* 2003). In the present investigation, we

found that goat *cumulus* cells have higher EGFR mRNA levels in GI/GII than in GIII COCs, independently of the hormonal treatment. Before, our group found no differences in the EGFR expression in *cumulus* cells of GI/GII when compared to GIII COCs from goats submitted to hormonal ovarian stimulation with three doses of FSH (Almeida *et al.* 2010). In that work, we could not correlate the goat COC morphological grade to the receptor mRNA level.

Despite of the dissimilarities in mRNA levels among the goat COCs from the two ovarian stimulation protocols, we could not detected phenotypic differences in the *in vitro* maturation step. Thus, the EGFR transcript level in *cumulus* cells of GI/GII COCs (selected for IVM) originated from the standard gonadotrophic treatment was not associated with oocyte meiotic competence, once nuclear maturation rate of this group did not differed from that of one-shot derived GI/GII structures. Additionally, molecular dissimilarities verified in goat COCs before IVM were also observed after this process. Thus, when comparing the two treatments, the differences among the EGFR expression in *cumulus* cells were maintained after IVM. Particularly, the standard protocol-derived *cumulus* cells had higher levels of EGFR than one-shot, before (Pre-IVM) and after (Post-IVM) maturation. Furthermore, the EGF transcripts were significantly higher in goat MII oocytes derived from standard than one-shot protocol. Also, when comparing the two treatments, no differences were observed in the expression of EGF in *cumulus* cells or EGFR in oocytes. Taking together, these results point out to some differences in the *in vivo* pre-maturation storage of transcripts of the goat COCs, which were to some extent reflected in the gene expression patterns during IVM process.

Terminal follicular growth and oocyte maturation are critical phases to generate developmentally competent oocytes (Hsieh *et al.* 2009). Many of the maternally derived products needed for development are stored in the oocyte during its growth (Hay-Schmidt *et al.* 2001). Even the underlying molecular events remain largely unknown (Bonnet *et al.* 2008; Ferreira *et al.* 2009). The suboptimal store of maternal RNA is believed to negatively impact subsequent embryo development. In fact, gene expression in early stage embryos relies mostly on post-transcriptional control of maternal transcripts accumulated during follicular development and oocyte maturation (Dieleman *et al.* 2002; Romar *et al.* 2009). In the cow, mRNA transcripts and proteins from the oocyte govern initial embryonic development after fertilization until the 4th cell cycle when embryonic control of development becomes evident (Hay-Schmidt *et al.* 2001). In the present work, the transcript level differences in LOR-derived COCs of hormonally treated goats could contribute to the oocyte stores RNA necessary to sustain early embryonic development, or to the processes of final follicular development. It is possible that this issue could be accessed by the performance of the goat COCs in the subsequent steps of the *in vitro*

embryo production. However, it is speculative, since embryo production was not evaluated in the present work.

Concerning the IVM process, we also evaluate the gene expression pattern of goat COCs before and after maturation. In general, the EGFR expression was much higher than its ligand EGF in both goat oocytes and *cumulus* cells. Interestingly the receptor mRNA was detected in goat oocytes and its level grew up during the IVM process, irrespective of the hormonal treatment for ovarian stimulation. This was the most significant result of this study and was in accordance with our previous report (Almeida *et al.* 2010). As showed here, the IVM process of goat COCs increases the EGFR expression in oocytes and *cumulus* cells and seems to be strongly correlated with the resumption of the meiosis. In general, EGF and EGF-like ligands enhance expansion of the COC and improve IVM of oocytes in a variety of species (Lonergan *et al.* 1996; Guler *et al.* 2000; Hatoya *et al.* 2009). It has been reported that the major site of action of EGFs that regulates oocyte maturation is the *cumulus* cells (Dows *et al.* 1988) acting through gap junctions (Conti *et al.* 2006). Nevertheless, the receptor was already described in oocytes of some species, such as pig (Uhm *et al.* 1999), macaque (Nyholt de Prada *et al.* 2009), mouse (Das *et al.* 1991) and goat (Gall *et al.* 2004). It is possible that these apparent disagreements were only originated from species specificities.

Besides having a mitosis-stimulating action on somatic cells, EGF is also known to induce resumption of meiosis in oocytes of various mammals, including rat (Hsu *et al.* 1987), mouse (Das *et al.* 1991; 1992), human (Westergaard and Andersen 1989), dog (Hatoya *et al.* 2009), sheep (Guler *et al.* 2000), cattle (Lonergan *et al.* 1996), pig (Uhm *et al.* 2010) and goat (Cognié *et al.* 2002). Nevertheless, the detailed downstream events in EGF-induced meiotic resumption are not well characterized and a direct action of EGF or EGF-like ligands in oocytes was already proposed to occur during IVM (Das *et al.* 1991; Lonergan *et al.* 1996). Thus, in bovine and in mouse, it was reported a maturation-promoting effect of EGF in naked oocytes, equivalent to (Lonergan *et al.* 1996) or lower than in cumulus-enclosed ones (Das *et al.* 1991). The EGF acted on germinal vesicle breakdown and polar body formation on oocytes, associated with minimal changes in cytoplasmic cAMP and independence of cumulus expansion (Downs *et al.* 1989). On the other hand, in some species as swine, regardless the occurrence of EGFR mRNA in immature oocytes (Uhm *et al.* 1999), the presence of cumulus cells seems to be essential for the EGF action, since nuclear maturation significantly decreased in denuded oocytes (Uhm *et al.* 2010).

Similar to our results, Gall *et al.* (2004), using immunofluorescence, western blot and RT-PCR assays, had already shown the presence of EGFR in meiotic competent and

incompetent goat oocytes, as well as in *cumulus* cells. Surprisingly, the researchers never observed goat oocyte EGFR phosphorylation during the *in vitro* maturation process (Gall *et al.* 2005). It was suggested that EGFR in oocytes were not mature and were unable of becoming phosphorylated with the presence of EGF in the culture medium. However, as proposed for rhesus monkey by Nyholt de Prada *et al.* (2010), it is possible that exogenous EGF fail to act through EGFR, which could be activated by endogenous EGF-like ligands. Furthermore, we hypothesized that the goat oocyte receptor probably has a physiologic role, once both mRNA and protein were already detected in this cell. Additionally, the significantly higher EGFR transcript level of MII oocytes, relative to immature or non-competent structures, found in the current study also support this proposition. Taking these findings together, we speculate a direct function, even partial, of EGFR in oocyte maturation, not mediated by *cumulus* cells.

Finally, besides high levels of EGFR mRNA, we found a very low EGF ligand levels in goat oocytes and *cumulus* cells. These findings indicate that the expression of this growth factor from goat cells, other than *cumulus* or oocyte, most likely accounts for the ongoing beneficial effects of the EGFR pathway on goat IVM. The highest expression of EGF was observed in MII oocytes derived from standard hormonal treatment. In these structures, a role for EGF-like ligands acting directly on oocyte and *cumulus* cells through an autocrine/paracrine pathway is possible. However, additional investigations are necessary to clarify these findings.

In conclusion, the COCs produced by standard and one-shot FSH treatments for goat ovarian stimulation were somewhat different concerning EGF and EGFR gene expressions. However, such differences could not be associated with developmental competence, at least until the maturation step for *in vitro* embryo production. Interestingly, the *in vitro* maturation strikingly increased the EGFR expression in both oocytes and *cumulus* cells. These found seems to be strongly correlated with the resumption of the meiosis, and point to an action through the *cumulus* cells or directly on the oocyte receptor. This research allows us to obtain a molecular sketch of which factors may be available to the oocyte after *in vivo* pre-maturation and *in vitro* maturation, and that could to influence the *in vitro* embryo production and related technologies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge to Suely R.G. Avelar and Karlliely de C. Almeida for the assistance during oocyte recovery and manipulation. A.F. Pereira is a recipient of a scholarship from Funcap (Fortaleza, Brazil), L.M. Melo is a recipient of a post-doctoral

scholarship from CAPES (Brasília, Brasil) and V.J.F. Freitas is CNPq senior investigador (Brasília, Brazil).

REFERENCES

- Ali, A., and Sirard, M. A. (2002). The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote* **10**, 65–71.
- Almeida, K. C., Pereira, A. F., Alcântara Neto, A. S., Avelar, S. R. G., Bertolini, L., Bertolini, M., Freitas, V. J. F., and Melo, L. M. (2010). Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in *cumulus*-oocyte complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats. *Zygote* (in press).
- Baldassarre, H., De Matos, D. G., Furnus, C. C., Castro, T. E., and Cabrera Fische, E. I. (1994). Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim. Reprod. Sci.* **35**, 145–150.
- Baldassarre, H., Furnus, C. C., De Matos, D. G., and Pessi, H. (1996). *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculogenesis alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* **45**, 707–717.
- Baldassarre, H., Keefer, C., Wang, B., Lazaris, A., and Karatzas, C. N. (2003). Nuclear transfer in goats using *in vitro* matured oocytes recovered by laparoscopic *ovum pick-up*. *Cloning Stem Cells* **5**, 279–285.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C. L., Lazaris, A., and Karatzas, C. N. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic *ovum pick-up* and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology* **57**, 275–284.
- Bonnet, A., Dalbiès-Tran, R., and Sirard, M. A. (2008). Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. *Reproduction* **135**, 119–128.
- Choi, J. H., Choi, K. C., Auersperg, N., and Leung, P. C. (2005). Gonadotropins up regulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen activated protein kinases and phosphatidyl-inositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. *Endocr. Relat. Cancer* **12**, 407–421.
- Cocero, M. J., Alabart, J. L., Hammami, S., Martí, J. I., Lahoz, B., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J. F., and Folch, J. (2010). The efficiency of *in vitro* ovine embryo production using

an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reprod. Dom. Anim. (in press)*.

- Cognié, Y., Poulin, N., and Mermillod, P. (2002). Cysteamine improves *in vitro* goat oocyte maturation in defined medium. *Proc. 18th Meet. Assoc. Europ. Transfer. Emb.* 154.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J. Y., and Su, Y. Q. (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol. Endoc.* **20**, 715–723.
- Das, K., Phipps, W. R., Hensleigh, H. C., and Tagatz, G. E. (1992). Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation *in vitro*. *Fertil. Steril.* **57**, 895–901.
- Das, K., Stout, L. E., Hensleigh, H. C., Tagatz, G. E., Phipps, W. R., and Leung, B. S. (1991). Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil. Steril.* **55**, 1000–1004.
- Dieleman, S. J., Hendriksen, P. J., Viuff, D., Thomsen, P. D., Hyttel, P., Knijn, H. M., Wrenzycki, C., Kruip, T. A., Niemann, H., Gadella, B. M., Bevers, M. M., and Vos, P. L. (2002). Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of preimplantation embryos. *Theriogenology* **57**, 5–20.
- Downs, S. M., Daniel, S. A. J., and Eppig, J. J. (1988). Induction of maturation in *cumulus* cell-enclosed mouse oocytes by follicle stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J. Exp. Zool.* **245**, 86–96.
- Fair, T., Gutierrez-Adan, A., Murphy, M., Rizos, D., Martin, F., Boland, M. P., and Lonergan, P. (2004). Search for the bovine homolog of the murine *ped* gene and characterization of its messenger RNA expression during bovine preimplantation development. *Biol. Reprod.* **70**, 488–494.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**, 836–848.
- Freitas, V. J. F., Serova, I., Andreeva, L. E., Dyoryanchikov, G. A., Lopes-Junior, E. S., Teixeira, D. I. A., Dias, L. P. B., Avelar, S. R. G., Moura, R. R., Melo, L. M., Pereira, A. F., Cajazerias, J. B., Andrade, M. L. L., Almeida, K. C., Sousa, F. C., Carvalho, A. C. C., and Serov, O. L. (2007). Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *Na. Acad. Bras. Cienc.* **79**, 1–8.
- Freitas, V. J. F., Teixeira, D. I. A., Melo, L. M., Lopes Junior, E. S., Moura, R. R., Pereira, A. F., Sousa, F. C., Almeida, K. C., Avelar, S. R. G., Cajazeiras, J. B., Dias, L. P. B., Dvoryanchikov, G. A., Andreeva, L. E., Serova, I.A., and Serov, O. L. (2010). Generation of

- transgenic naturalized goats producing human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) in Brazil. *Transgenic Res.* **19**, 146.
- Gall, L., Boulesteix, C., Ruffini, S., and Germain, G. (2005). EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat *cumulus* cells during *in vitro* maturation. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 489–494.
- Gall, L., Chene, N., Dahirel, M., Ruffini, S., and Boulesteix, C. (2004). Expression of epidermal growth factor receptor in the goat *cumulus*–oocyte complex. *Mol. Reprod. Dev.* **67**, 439–445.
- Goossens, K., Van Poucke, M., Van Soom, A., Vandesompele, J., Van Zeveren, A., and Peelman, L. J. (2005). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev. Biol.* **5**, 27.
- Guler, A., Poulin, N., Mermillod, P., Terqui, M., and Cognié, Y. (2000). Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* **54**, 209–218.
- Hatoya, S., Sugiyama, Y., Nishida, H., Okuno, T., Torii, R., Sugiura, K., Kida, K., Kawate, N., Tamada, H., and Inaba, T. (2009). Canine oocyte maturation in culture: significance of estrogen and EGF receptor gene expression in *cumulus* cells. *Theriogenology* **71**, 560–567.
- Hay-Schmidt, A., Viuff, D., Greve, T., and Hyttel, P. (2001). Transcriptional activity in *in vivo* developed early cleavage stage bovine embryos. *Theriogenology* **56**, 167–176.
- Hsieh, M., Zamah, M., and Conti, M. (2009). Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Semin. Reprod. Med.* **27**, 52–61.
- Hsu, C. J., Holmes, S. D., and Hammond, J. M. (1987). Ovarian epidermal growth factor activity, concentration in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 242–247.
- Hunter, M. G., Robinson, R. S., Mann, G. E., and Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.* **82–83**, 461–477.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonckt, A., Donnay, I., Khatir, H., and Mermillod, P. (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* **54**, 1420–1429.
- Mourot, M., Dufort, I., Gravel, C., Algriany, O., Dieleman, S., Sirard, M. A. (2006). The influence of follicle size, FSH enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1367–1379.

- Nyholt de Prada, J. K., Lee, Y. S., Latham, K. E., Chaffin, C. L., and VandeVoort, C. A. (2009). Role for *cumulus* cell-produced EGF-like ligands during primate oocyte maturation *in vitro*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, 1049–1058.
- Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., and Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* **303**, 682–684.
- Racedo, S. E., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Salamone, D., Niemann, H. (2008). Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine *in vitro* matured oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 17–25.
- Rizos, D., Lonergan, P., Ward, F., Duffy, P., and Boland, M. P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 234–248.
- Romar, R., De Santis, T., Papillier, P., Perreau, C., Th  lie, A., Dell’Aquila, M. E., Mermillod, P., and Dalbi  s-Tran, R. (2010). Expression of maternal transcripts during bovine oocyte *in vitro* maturation is affected by donor age. *Reprod. Dom. Anim.* (in press).
- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I., and Richards, J. S. (2006). Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in *cumulus* oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1352–1365.
- Sirard, M. A. (2001). Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* **55**, 1241–1254.
- Stangl, M., K  hholzer, B., Besenfelder, U., and Brem, G. (1999). Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology* **52**, 709–716.
- Tervit, H. R. (1996). Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.* **42**, 227–238.
- Uhm, S. J., Gupta, M. K., Yang, J. H., Chung, H. J., Min, T. S., and Lee, H. T. (2010). Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* **73**, 1024–1036.
- Uhm, S. J., Chung, H. M., Kim, S. W., Kim, N. H., Lee, H. T., and Chung, K. S. (1999). Expression of epidermal growth factor receptor in porcine oocytes and preimplantation embryos. *Theriogenology* **51**, 258.
- Van Zutphen, L. F. M., and Balls, M. (1997). *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. (Elsevier: Amsterdam).
- Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J. G., and Armstrong, D. G. (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* **82**, 63–74.

- Westergaard, L. G., and Andersen, C. Y. (1989). Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles. *Hum. Reprod.* **4**, 257–260.
- Zhang, M., Ouyang, H., and Xia, G. (2009). The signal pathway of gonadotrophs induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol. Hum. Reprod.* **15**, 339–409.

1 **Table 1.** Primers employed to obtain quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in goat oocytes and *cumulus* cells.

Gene	Nucleotide sequence	Product size (bp)	GenBank accession number
EGF	5'-CAATTGATCCAGTAGCACGGTA-3'	56	U36428
	5'-GCCTGCCACCTCTGAAGAGC-3'		
EGFR	5'-AACTGTGAGGTGGTCCTTGG-3'	120	AY486452
	5'-CACTGTGTTGAGGGCAATGA-3'		
GAPDH	5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	119	XM_618013
	5'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'		

2

3 **Table 2.** Production *cumulus*-oocyte complexes (COCs) by laparoscopic recovery in hormonally treated goats for ovarian stimulation and *in vitro*
 4 maturation (IVM).

Gonadotrophic treatment (number of goats)	Collected COCs (mean per animal $\pm$ SD)	Grading of COCs (%)		IVM rate (%)
		GI/GII	GIII	
Standard (<i>n</i> =18)	211 (11.7 $\pm$ 4.9)	73.9	14.2	49.1
One-shot (<i>n</i> =17)	184 (10.8 $\pm$ 4.3)	70.1	16.8	46.1

5 P>0.05.

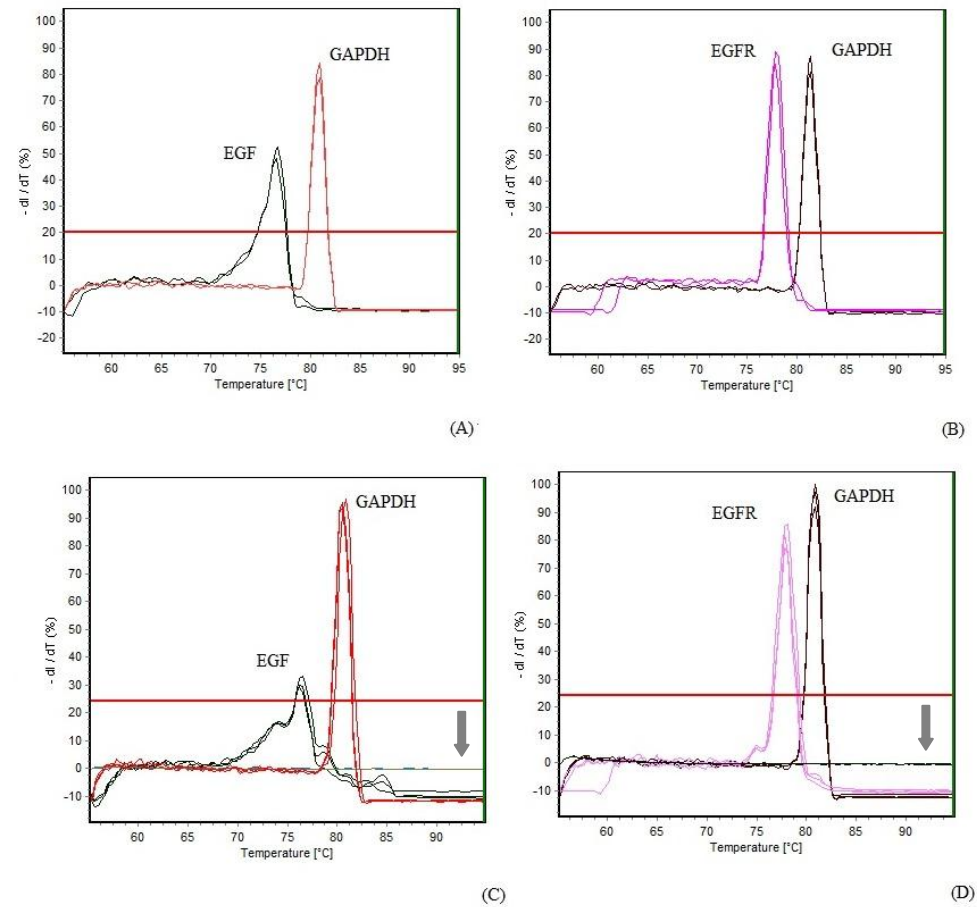


Fig. 1. Specificity of EGF, EGFR and GAPDH RT-qPCR amplifications in oocytes and *cumulus* cells. Derivative melting curves of EGF, EGFR and GAPDH amplicons in oocytes (A and B) and *cumulus* cells (C and D). Negative controls (arrows) were constituted of mRNA templates without reverse transcriptase.

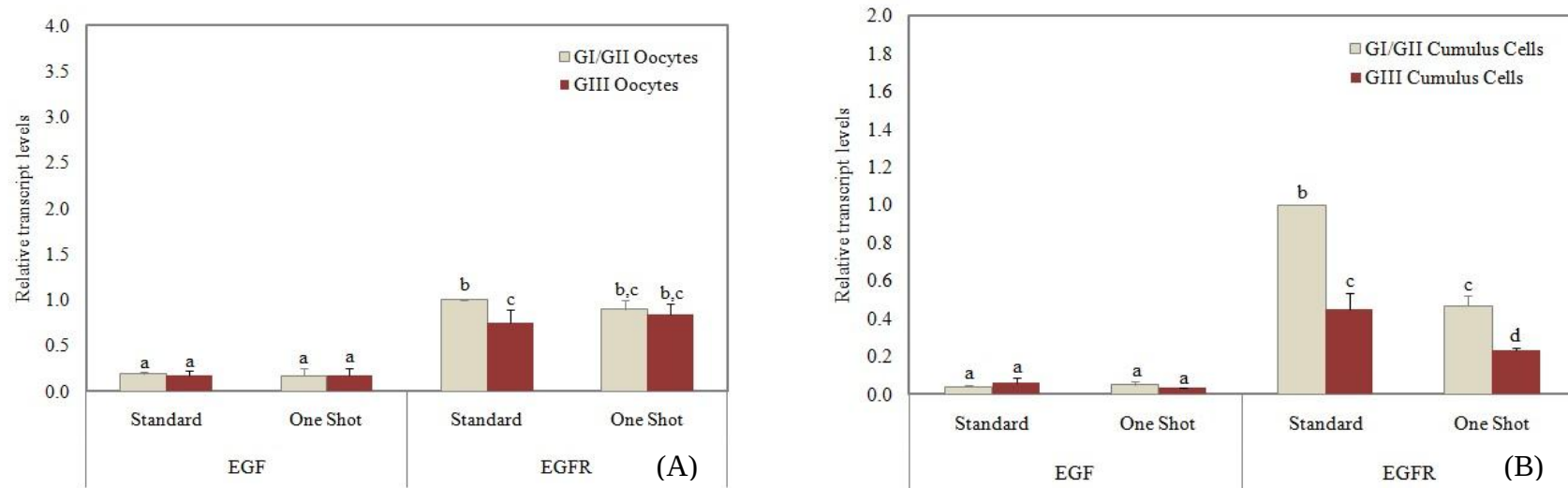


Fig. 2. Real-time RT-qPCR analysis of EGF and EGFR expression in goat (A) immature oocytes and (B) *cumulus* cells obtained from the standard or one-shot treatments for ovarian stimulation. The fold differences in mRNA expression after normalization to the internal standard (GAPDH). Within a figure, values without a common superscript differed ($P < 0.05$).

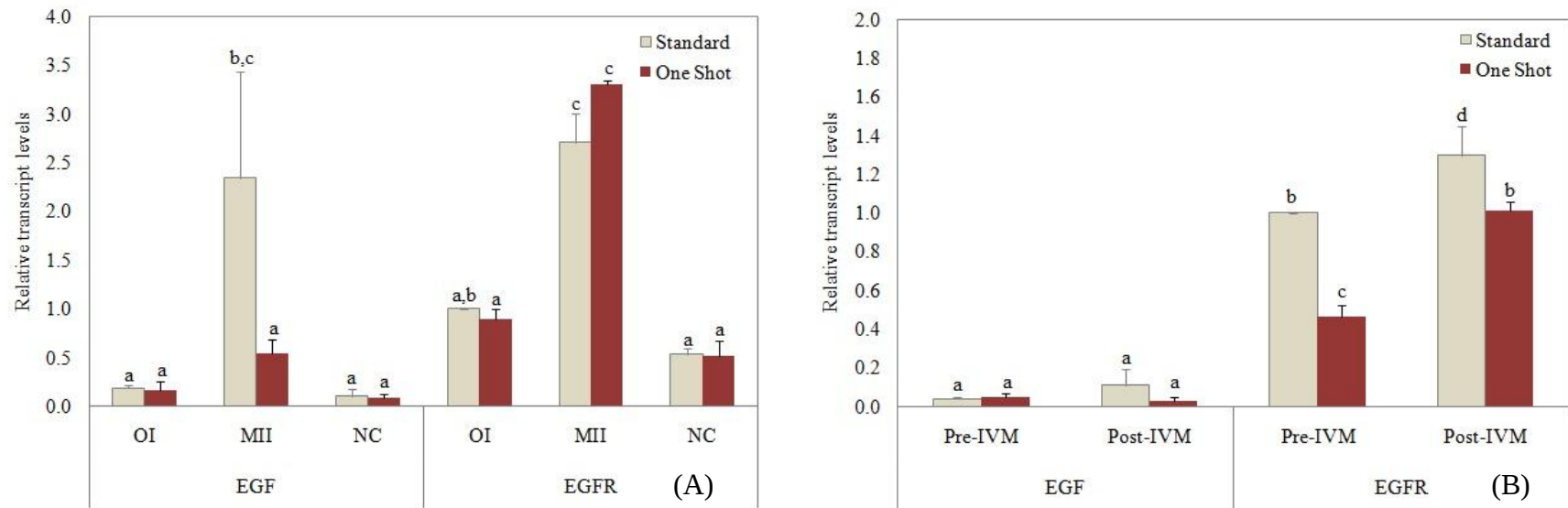


Fig. 3. Real-time RT-qPCR analysis of EGF and EGFR expression in goat (A) oocytes and (B) *cumulus* cells from pre- and post-IVM COCs obtained from the standard or one-shot treatment for ovarian stimulation. Shown are the fold differences in mRNA expression in the immature (OI), mature (MII) and non-competent (NC) oocytes, and in *cumulus* cells from pre- and post-IVM COCs, after normalization to the internal standard (GAPDH). Within a figure, values without a common superscript differed ($P < 0.05$).

7. CAPÍTULO II

QUANTITATIVE DETECTION OF DNA DAMAGE WITH HISTONE γ H2A.X DURING PREIMPLANTATION DEVELOPMENT OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED BY *IN VITRO* FERTILIZATION, PARTHENOGENETIC ACTIVATION AND SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER

DETECÇÃO QUANTITATIVA DE DANO AO DNA COM HISTONA γ H2A.X DURANTE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTACIONAL DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS POR FECUNDAÇÃO *IN VITRO*, ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA E TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Periódico: BMC Developmental Biology

Fator de Impacto: 3.29.

(Em processo de submissão)

Quantitative detection of DNA damage with histone γ H2A.X during preimplantation development of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer

Alexsandra Fernandes Pereira¹, Luciana Magalhães Melo¹, Vicente José de Figueirêdo Freitas¹
and Daniel Felipe Salamone^{2*}

Address: ¹ Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, School of Veterinary Medicine, Ceará State University, Av. Dedé Brazil 1700, Fortaleza-CE, Brazil, ² Laboratory of Animal Biotechnology, School of Agronomy, Buenos Aires University, Av. San Martín 4453, C1417, Buenos Aires, Argentina

Email: Alexsandra F. Pereira - ale_lfcr@yahoo.com.br; Luciana M. Melo - lucianamelo.uece@gmail.com; Vicente José de F. Freitas - vjff@pq.cnpq.br; Daniel F. Salamone* - salamone@agro.uba.ar

* Corresponding author

ABSTRACT

Background: The phosphorylated H2A.X, named as γ H2A.X, forms clusters at each DNA damage site and enables to visualize as nuclear *foci* with the anti- γ H2A.X antibody. γ H2A.X *foci* may play an essential role in the efficient recruitment of proteins involved in the DNA repair. Therefore, H2A.X function is essential for DNA repair and genomic stability. Embryos produced from *in vitro* manipulation present DNA damages derived from exposure to artificial conditions. Here, we analyzed the DNA damage during bovine *in vitro* preimplantation development. *In vitro* fertilized (IVF), parthenogenetically activated (PA) and cloned by somatic cell nuclear transfer (SCNT) bovine embryos were evaluated for γ H2A.X quantification at different developmental stages (1-cell, 2-cell and blastocyst).

Results: By using the confocal immunofluorescence staining approach, we showed DNA damage in bovine preimplantation embryos according to two quantitative parameters: number of γ H2A.X *focus*/nucleus and chromatin area with damage/nucleus. In early developmental stages, pronucleus 1 (large size pronuclei) of *in vitro* fertilized embryos showed a number of γ H2A.X *focus*/nucleus four times greater than nucleus of SCNT 1-cell embryos (309.5 ± 70.2 versus

73.7±17.6, respectively, $P<0.05$). However, this pattern did not happen for the chromatin area with damage ($P>0.05$). On the other hand, both parameters were greater in PA-derived blastocysts when compared to IVF and SCNT embryos ($P<0.05$). In relation to γ H2A.X dynamics during the development of embryos produced by different process, both parameters did not differ between fertilized (1-cell and 2-cell) embryos. Interestingly, blastocysts produced by IVF show a reduction in relation to two parameters when compared to 1-cell embryos (134.7±30.6 versus 493.0±111.1 to number of γ H2A.X focus/nucleus and 1511.8±365.0 versus 11491.7±3046.8 pixels to chromatin area with damage/nucleus, respectively, $P<0.05$). In comparison to development of SCNT embryos, the chromatin area with damage in TNCS embryos was reduced in blastocysts when compared to early embryos (1622.1± 641.4 versus 3074.3±654.8 versus 12578.9±6014.5 for blastocyst, 1-cell and 2-cell, respectively, $P<0.05$).

Conclusions: In bovine preimplantation embryos, blastocysts derived of PA presented a greater DNA damage response when compared to IVF and SCNT blastocysts. Such occurrence reflected in a high blastocyst rate in parthenotes when compared with other groups (IVF and SCNT). This knowledge may help in the understanding of the processes involved during bovine preimplantation development of fertilized, parthenogenetically activated and cloned embryos, besides being also important for other technologies such as transgenesis.

BACKGROUND

Reproductive biotechnologies are tools widely used in cattle for different purposes, as basic research on developmental biology, production of transgenic animals and commercial applications [1]. *In vitro* embryo production by *in vitro* fertilization (IVF), parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) is employed to these applications [2-4].

Various studies have investigated the *in vitro* culture conditions and systems correlated with DNA damage [5, 6]. The increase in DNA damage caused by oxygen concentration, for example, was positively correlated with a reduced developmental potential of the embryos and was probably a contributory factor for this restriction in development [5]. During the preimplantation period, embryos need an efficient DNA repair machinery, so that the DNA damage occurring during this period is not amplified by the subsequent cell cycles, which can eventually result in further cell death by apoptosis. Cellular response to double strand breaks (DSBs) involves key proteins that function by delaying cell cycle thereby allowing repair of DNA damage [7]. Cell cycle checkpoints become activated upon DNA damage and are essential to allow proper progression through the cell cycle and safeguard the integrity of the genetic

information [8, 9]. Damage response is composed of three components: damage sensors, signal transducers, and effectors to transmit signals from damaged DNA to the machineries executing any of the three functions of damage response, cell cycle arrest, apoptosis and DNA repair networks [10].

Histone H2A.X is one of the H2A variants with a conserved Ser-Gln-Glu motif at the carboxyl-terminal of the protein, and the serine 139 of this motif is rapidly phosphorylated by ataxia-telangiectasia mutated (ATM) within minutes after irradiation [11-13]. The phosphorylated form of H2A.X is designated as γ H2A.X, and forms *foci* at the site of DNA damage which then serve as a platform to recruit various repair and cell cycle checkpoint proteins [14]. γ H2A.X is most likely to play important roles in DNA repair and chromatin remodeling during DNA damage response. It has been suggested that γ H2A.X promotes recombination and conformational changes of chromatin [8,15]; hence chromatin reorganization by γ H2A.X could prevent the premature separation of broken ends, a function that would safeguard against harmful chromosome rearrangements.

Irradiated mouse embryos showed delayed phosphorylation of H2A.X when they progressed to the morula stage. In contrast, γ H2A.X *foci* were immediately induced after irradiation of post-compaction stage embryos. These results demonstrate that one of the ATM pathways operates in a stage specific manner during preimplantation stage development of mouse embryos [16].

DNA damage that occurs during the preimplantation period could be attributed to several factors. However, *in vitro* produced embryos, among these factors highlight the environment of *in vitro* and technique used for activation of development (*in vitro* fertilization and parthenogenetic cloning). Therefore, the aim of this study was to evaluate the DNA damage mediated by histone γ H2A.X during the period of pre-implantation bovine embryos produced by IVF, SCNT and PA.

METHODS

Reagents

Except where otherwise indicated, all chemicals were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Oocyte collection and in vitro maturation

Bovine ovaries were collected from local slaughterhouse and transported to the laboratory. *Cumulus*-oocyte complexes (COCs) were recovered by aspiration of 2 to 8 mm follicles using 18-gauge needle and collected in TCM-HEPES (31100-035; Gibco, Grand Island, NY, USA; H4034) containing 10% v/v fetal bovine serum (FBS, 013/07; Internegocios, Buenos Aires, Capital Federal, Argentina), and 2% v/v antibiotic-antimycotic (ATB, 15240-096; Gibco). Prior to *in vitro* maturation (IVM), oocytes surrounded by at least three layers of granulosa cells and with a compact and evenly granulated cytoplasm were selected. Then, 35-40 COCs were transferred into 100 μ L droplets of maturation medium overlaid with mineral oil (M8410), in 35 mm Petri-dishes. The maturation medium was bicarbonate-buffered TCM-199 (31100-035; Gibco), containing 10% v/v FBS, 10 μ g/mL follicle stimulating hormone (Folltropin®, Bioniche, Belleville, ON, Canada), 0.3 mmol/L sodium pyruvate (P2256), 100 μ mol/L cysteamine (M9768) and 2% v/v ATB. The IVM conditions were 6.5% CO₂ in humidified air at 39°C for 21 h, 22 h and 27 h for SCNT, IVF and PA groups, respectively. After maturation, and only used oocytes for SCNT and PA, *cumulus* cells were completely removed by vortexing COCs in 0.1% hyaluronidase (H4272) in Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS, 14287-072; Gibco, Grand Island, NY, USA) during 2 min and washed three times in HEPES-buffered Tyrode's medium albumin, lactate and pyruvate (TALPH). Matured oocytes, evaluated by visualizing the first polar body, were immediately used for SCNT and PA, whereas intact COCs were used for IVF.

In vitro Fertilization (IVF)

The IVF procedure was previously described by Brackett and Oliphant (1975) [17]. Briefly, bovine frozen semen was thawed in a 37°C water bath for 30 s. Spermatozoa were washed twice by centrifugation at 400 g x 5 min with Brackett's defined medium. Sperm concentration was adjusted to 15 x 10⁶/mL and sperm then co-incubated for 5 h with COCs in 100 μ L droplets Brackett's fertilization medium. The IVF conditions were 6.5% CO₂ in humidified air at 39°C. Afterward, the presumptive zygotes were washed three times in TALPH and *in vitro* cultured as follows.

Parthenogenetic activation (PA)

Matured oocytes were activated by a combined ionomycin (I24222; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP; D2629) treatment. Briefly, oocytes were activated in TALPH with 5 μ M ionomycin for 4 min, followed by washing in TALPH. These oocytes were then incubated in Synthetic Oviductal Fluid (SOF) containing 1.9 mM 6DMAP for

3 h. After this incubated, 6-DMAP was removed by washing oocytes three times in TALP-H, followed the *in vitro* culture.

Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)

Preparation of recipient cytoplasts and nuclear transfer procedures were derived as described previously [18].

Preparation of recipient cytoplasts

To remove zona pellucida, matured oocytes were brief treated with 1.5 mg/mL pronase (P8811) in TALPH, using a warm plate. When the zona was dissolved, oocytes were washed in TALPH to inactivate the enzyme. Zona-free oocytes were incubated with 1 µg/mL Hoechst 33342 (B2261) and 10 µg/mL cytochalasin B in TCM199/FBS for 5 min before transfer into a TALPH/FBS/cytochalasin B droplet on the microscope stage. They were enucleated under constant UV-light exposure. Enucleation was performed using 25 µm outer diameter pipettes, by which the cytoplast was moved out of the ultraviolet (UV) light (<10s). Cytoplast and karyoplast were separated with a simple separation needle. The integrity of the cytoplast was assessed by evaluation of stained metaphase II chromosomes inside the pipette, confirming successful enucleation.

Preparation of donor karyoplasts and attachment of donor cells

Fetal fibroblasts were used for SCNT. Fibroblasts were isolated, frozen and cultured by standard procedures. Prior to cloning, cell synchronization was performed by serum starvation (0.5% FBS) for 72 h before being used as donor nuclei. Trypsinized somatic donor cells were resuspended in TALPH and aliquoted into 100 µL drops covered under mineral oil. About 10 individual cells were picked up with a mouth pipette and added to a drop of 10 mg/mL phytohemagglutinin (PHA-P; L8754) in TALPH, already containing 10 cytoplasts. Cytoplasts and donor cells were pushed together with the mouth pipette, incubated for at least 5 min, and then groups of 10 couplets were transferred into TALPH without PHA-P.

Zona free SCNT-embryos fusion and artificial activation

Following cell adhesion, fusion of somatic cells was carried out by manually aligning cells in a fusion chamber (BTX Instrument Division; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) so that the membranes were parallel to the electrodes. Reconstructed embryos were electrofused by two 1.2 kV/cm DC pulses for 30 µs (Electroporator ECM830; BTX Instrument Division;

Harvard Apparatus). Fusion was performed at room temperature. Couplets were removed from the fusion chamber and put back into TCM199/FBS to score fusion success and detect detached or lysed donor cells. Fusion outcome was assessed within 60 to 90 min. Reconstructs were activated 2-3 h post-fusion, using a combination of ionomycin and 6-DMAP as described for PA. Activation was initiated 27.5 h after the onset of maturation.

In vitro embryo culture conditions and evaluation of embryo development

All structures were cultured *in vitro* in 50 μ L droplets of SOF supplemented with 2.5% v/v FBS and 0.4% BSA under mineral oil. Cloned embryos were put individually in microwells using the well-of-the-well (WOW) system based on Vajta *et al.* [19]. Culture conditions were 6.5% CO₂ in humidified air at 39°C. Presumptive zygotes (IVF or PA) were transferred to new droplets at Days 2 and 5, whereas SCNT embryos had replaced 50% of the medium with fresh medium supplemented with 5% FBS at Day 5. One-cell (1-cell) embryos were collected at 16 h after initial of the co-incubation spermatozoa-oocyte, oocyte activation, and reconstructed zygotes in IVF, PA and SCNT, respectively. Two-cell (2-cell) embryos and blastocysts (Bl) were recovered at 24 h and 7 days after initial of the *in vitro* culture. Moreover, cleavage was evaluated on Day 1-2, and the number of blastocysts on Days 7-8 post *in vitro* culture.

Indirect Immunofluorescence analyses

Whole-mount immunofluorescence for γ H2A.X quantitative detection was performed on bovine embryos obtained by the three methods (IVF, PA and SCNT) and in three developmental stages (1-cell, 2-cell and blastocyst). Briefly, embryos were fixed immediately after collection. After removal of the zona pellucida (IVF and PA embryos) by digestion with pronase for 3 min, embryos were washed three times in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min and then permeabilized for 30 min at room temperature with PBS containing 0.1% v/v Triton X-100 and 3% FBS. They were washed three times in 0.1% Tween PBS (PBS-T, H5152, Promega), blocked and incubated with anti-phospho-Histone H2A.X antibody (1:100 dilution, 05-636, Upstate Biotechnology, Upstate, NY, USA) in 3% FBS 0.1% Tween in PBS for 2 h at 37°C. All embryos were then washed twice in PBS-T, blocked for 30 min and incubated for 45 min at 37°C with second antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (F6257, anti-rabbit IgG, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in PBS-T in the dark. The immunostained embryos were washed with PBS containing 0.1% Triton-X, counter-stained with propidium iodide (1:100 dilution) in the dark for 10 min to visualize the DNA.

Stained embryos were mounted on slides, in 70% glycerol. Negative controls for γ H2A.X detection were produced only with the secondary antibody.

Confocal laser scanning microscopy

All embryos were analyzed on a Nikon Confocal C.1 scanning laser microscope. An excitation of 488 nm wavelength was selected from an argon-ion laser to excite the secondary antibody and a 544 nm wavelength to excite the propidium iodide. When necessary, images of serial optical sections were recorded every 1.5-2 μ m vertical step along the Z-axis of each embryo. Three-dimensional images were constructed using software EZ-C1 2.20.

Images analyses and γ H2A.X quantification

At least ten (1-cell and 2-cell) and five blastocyst images of independent replications were randomly collected from each embryo *in vitro* production systems. Integrated fluorescence intensities of nuclei were measured using ImageQuantiTL software (GE Healthcare, Amersham Biosciences Corp., Piscataway New Jersey, USA). At 1-cell, IVF-derived embryos showing two pronuclei were graded as pronucleus 1 (larger size pronuclei) and pronucleus 2 (small size pronuclei). Both pronuclei were evaluated separately in each structure.

After subtracting the background, each nucleus was manually outlined and exposed for quantifying the number of γ H2A.X *foci* and chromatin area with damage. Number of γ H2A.X *foci* in each image was analyzed as being all spot measured by software. The area of the nucleus was considered as the area of the spot displaying the number of pixels quantified in the image in order to produce the measurements. This area in each image was also used to adjust the count with respect to the average nucleus area, because nucleus size varied considerably within the cell population.

Statistical analyses

All data were expressed as mean of individual values obtained from at least ten replications by embryo *in vitro* production system. For all statistical analyzes, the Graphpad software was used. Cleavage rate was based on number of cleavage embryos at Day1-2 divided by embryos in culture. Blastocyst rate was calculated as the percentage of blastocyst at Day 7-8 divided by cleavage embryos. Cleavage and blastocyst rates were compared using ANOVA following Tukey-Kramer test.

Differences in number of γ H2A.X *foci*/nucleus and chromatin area with damage/nucleus were analyzed using Dunn's multiple comparisons test. Comparisons were performed among

embryonic developmental stage and embryo *in vitro* production systems. To compare between embryonic developmental stages, pronuclei of IVF 1-cell embryos were analyzed individually. Moreover, the nuclear ploidy of the IVF and SCNT derived embryos were reduced to the half for analyses with PA derived embryos. To compare between embryo *in vitro* production systems, pronuclei of IVF 1-cell embryos were analyzed as a cluster of values of pronucleus (1 and 2). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Developmental competence

To carry out this study, a total of 1889 oocytes cultured *in vitro* in maturation medium were allocated to three groups: IVF ($n = 350$), PA ($n = 500$) and SCNT ($n = 1049$). Analysis of the maturation rate of oocytes used in the PA and SCNT groups evaluated by the extrusion of polar body, assessed after removal of *cumulus* cells, was 76.6% (1183/1549). For SCNT, a total of 691 matured oocytes had their zona pellucid removed with an efficiency of 88.3% (614/691). The enucleation and fusion rates for zona-free oocytes was 90.4% (556/614) and 86.1% (480/551), respectively.

The developmental rates of preimplantation embryos obtained by: IVF, PA and SCNT are shown in Table 1. Cleavage rates were similar ($P > 0.05$) in all experimental groups, 77.0% (142/184), 75.1% (264/350) and 83.5% (218/270) from IVF, PA and SCNT, respectively. However, blastocysts rate was consistently higher in PA compared with SCNT ($P < 0.05$). The competence of cleaved embryos in developing to blastocysts was 19.9% (28/142), 31.0% (82/264) and 8.0% (18/218) from IVF, PA and SCNT, respectively.

γ H2A.X quantification in IVF-, PA- and SCNT-derived embryos during preimplantation development

In Figure 1 is shown representative images of embryos (1-cell, 2-cell and blastocysts) stained with the anti- γ H2A.X antibody and exposed to fluorescent light. The presence of γ H2A.X levels was detected in all stages of preimplantation development analyzed in embryos from all experimental groups. Mean number of γ H2A.X *focus*/nucleus and chromatin area with damage/nucleus were used to perform a quantitative evaluation of DNA damage response with γ H2A.X in all groups. Initially, a correlation between these two parameters was shown to be positive for all nuclei with an $R = 0.79$ (Figure. 2).

At the 1-cell stage, the quantification average of number of γ H2A.X *focus*/nucleus was similar in IVF and PA zygotes (309.5 ± 70.2 versus 183.5 ± 45.0 versus 164.6 ± 38.2 for IVF-pronucleus 1 (large size pronucleus), IVF-pronucleus 2 (small size pronucleus) and PA-pronucleus, respectively, $P > 0.05$). Nevertheless, in early developmental stages, pronucleus 1 of fertilized embryos showed a number of γ H2A.X *focus*/nucleus greater than pronucleus-like nucleus of SCNT 1-cell embryos (309.5 ± 70.2 versus 73.7 ± 17.6 , respectively, $P < 0.05$, Figure. 3A). This pattern was not seen for the damaged chromatin area (7007.1 ± 2133.0 versus 1537.1 ± 327.4 , $P > 0.05$) (Figure. 4A). Also, no differences were observed for both studied parameters in 2-cell embryos from different embryo types produced *in vitro* (Figures. 3B and 4B).

For blastocyst stage, both parameters, number of γ H2A.X *focus*/nucleus (122.0 ± 16.9 versus 67.4 ± 15.3 versus 59.6 ± 10.9 , $P < 0.05$) and chromatin area with damage/nucleus (2183.0 ± 651.9 versus 755.9 ± 182.5 versus 811.0 ± 320.7 , $P < 0.05$), were greater in PA-derived blastocysts when compared to IVF and SCNT embryos, respectively (Figures 3C and 4C).

Regarding to embryo kinetics of development in embryos produced by different *in vitro* embryo production systems, both parameters did not differ between fertilized (1-cell and 2-cell) embryos. Interestingly, blastocysts produced by IVF showed a reduction in relation to two parameters when compared to 1-cell embryos (134.7 ± 30.6 versus 493.0 ± 111.1 for number of γ H2A.X *focus*/nucleus and 1511.8 ± 365.0 versus 11491.7 ± 3046.8 pixels for damaged chromatin area/nucleus, respectively, $P < 0.05$). (Figures 3D and 4D).

The mean number of γ H2A.X *focus*/nucleus (164.6 ± 38.2 versus 320.5 ± 110.2 versus 122.0 ± 16.9) and chromatin area with damage/nucleus (2837.2 ± 720.0 versus 6550.5 ± 2329.4 versus 2183.0 ± 651.9) did not differ among PA 1-cell, 2-cell and blastocysts, respectively ($P > 0.05$) (Figures 3E and 4E).

In relation to SCNT embryos, no difference was observed in number of γ H2A.X *focus*/nucleus (147.4 ± 35.1 versus 553.3 ± 216.0 versus 119.1 ± 20.7) in cloned embryos of 1-cell, 2-cell and blastocysts, respectively ($P > 0.05$) (Figures 3F). However, the chromatin area with damage in TNCs embryos was reduced in blastocysts when compared to early embryos (1622.1 ± 641.4 versus 3074.3 ± 654.8 versus 12578.9 ± 6014.5 for blastocyst, 1-cell and 2-cell, respectively, $P < 0.05$, Figure 4F).

DISCUSSION

The present study demonstrates the peculiarity of DNA damage response in bovine preimplantation stage embryos derived by different process: IVF, PA and SCNT. In particular, the pattern of H2A.X phosphorylation underwent dynamics changes during preimplantation stage development. Phosphorylation of H2A.X is one of the first steps of damage response and γ H2A.X is a platform for many damage response proteins/complexes to assemble [16].

In mammals, fertilization occurs in the oviduct, where sperm encounters and fuses with the oocyte. As a result the oocyte nucleus, which had been arrested in metaphase II, completes meiosis and the two parental pronuclei fuse to form the diploid zygotic nucleus. Progressive epigenetic modification of DNA of both paternal and maternal genomes begins after fertilization leading later to epigenetic reprogramming, extending until the stage of 8-16 cells occurs when the embryonic genome activation in bovine (REF).

The bovine male pronucleus is morphologically distinct from the female version and is identified as follows: (1) usually slightly larger than the female counterpart [20] and distal from the polar body; (2) relatively decondensed [21]. In the present study, no statistically significant differences were observed between the male pronucleus (PN1) and female pronucleus in 1-cell obtained from IVF (PN2) and PA (PN) in relation to the number of γ H2A.X *focus*. However, the number of γ H2A.X *focus* in the embryos of 1-cell obtained by SCNT 16 h after activation of development differed significantly. Prior to gamete fusion, during spermiogenesis, the postmeiotic spermatid nucleus undergoes a rigorous alteration of its chromatin, stepwise removing most of the nucleosomes from the DNA and replacing them with protamines which enable the high degree of compaction found in the sperm nucleus [22]. After entry in the oocyte, reversal of nucleosome based chromatin is a necessity to enable progression into a pronucleus that can enter S-phase in conjunction with the maternal pronucleus [23]. The spermatid nucleus is devoid of DNA repair upon the start of protamine-induced compaction at stage 12 of spermatogenesis [24-25], some two weeks before ejaculation. Hence, DNA lesions present in the paternal nucleus at this period will have to be repaired after entry into the oocyte, by stored factors. Bearing in mind the above, the largest number of γ H2A.X *focus* observed in the paternal chromosome can be attributed to damage occurring in DNA during the compaction process.

Epigenetic modification of DNA (methylation of cytosine in the dinucleotide CpG) and/or associated (phosphorylation, acetylation and methylation of histones) are responsible for regulation of gene expression without changing the DNA sequence [26]. Methylation of the DNA is recognized as a principal contributor to the stability of gene expression state [27]. The genomic methylation pattern is generally stable and heritable in differentiated somatic cells; however, genome-wide reprogramming has been reported to occur in germ cells and

preimplantation embryos [28]. The reprogramming process includes erasing the existing epigenetic marks and re-establishing new cell-specific marks to generate cells with nuclear totipotency and broad developmental potential [28-29]. However, this reprogramming process leads to DNA damage. Based on this, we hypothesized that a greater number of γ H2A.X *focus* in zygotes obtained by SCNT is due to increased need for nuclear reprogramming. However this was not confirmed in this study, when comparing this parameter between the three groups (IVF, PA and SCNT). Additionally the size of damaged area (proportion of damaged area and the area of the nucleus) did not differ between embryos obtained from three groups. These data are consistent with the results of cleavage rates which were not different among embryos obtained by different *in vitro* embryo production systems.

The comparison of the number of γ H2A.X *focus* between embryos at different stages of development (1-cell, 2-cell and blastocyst) obtained by IVF significant difference between embryos at the stage of 1-cell and blastocyst. However, these two stages of development did not differ from the zygote to 2-cell stage. This result demonstrates that the period that there was more DNA damage increased during the pre-implantation is pronuclear stage and that this damage is mainly the legacy of the compaction process of sperm DNA [30]. Corroborating this hypothesis, no difference at any stage of development in embryos produced by SCNT and PA was detected.

CONCLUSION

There is difference in DNA damage level mediated by histone γ H2A.X, during the preimplantation period of bovine embryos produced by parthenogenetic activation compared to embryos produced by IVF and SCNT at stage of blastocyst. This greater DNA damage reflected in higher blastocyst rate observed in this group (PA) than other groups (IVF and SCNT). This knowledge will help to understand the processes involved in bovine preimplantation development of fertilized, parthenogenetically activated and cloned embryos, besides it is also important for other technologies such as transgenesis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.F. Pereira has designed the study, acquired and analyzed the data, and drafted the paper, L.M. Melo and V.J.F. Freitas analyzed data and drafted paper, revising it critically and

D.F. Salamone designed the study, acquisition and analyzed data, drafted paper, revising it critically.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by PICT CABBIO, UBACYT and CNPq. The authors thank Dr Rincon for her technical support and the following abbatoirs, Amancay (Dr. Silva), Nueva Escocia (Dr. Saenz), and Merlo (Marcelo Danielli), for providing biological material. A.F. Pereira is a recipient of a scholarship from FUNCAP (Fortaleza, Brazil) and sandwich-doctor scholarship from CAPES (Brasília, Brazil), L.M. Melo is a recipient of a post-doctoral scholarship from CAPES (Brasília, Brasil) and V.J.F. Freitas is CNPq senior investigator (Brasília, Brazil). D.F. Salamone is CONICET independent investigator (Buenos Aires, Argentina).

REFERENCES

1. Gali C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G: **Bovine embryo technologies**. *Theriogenology* 2003, **59**: 599-616.
2. Camargo LS, Freitas C, de Sa WF, de Moraes Ferreira A, Serapio RV, Viana JH: **Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro*-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos**. *Anim Reprod Sci* 2010, **120**: 10-15.
3. Pashaias IM, Khodadadi K, Holland MK, Verma PJ: **The efficient generation of cells lines from bovine parthenotes**. *Cell Reprogram* 2010, **12**: 571-579.
4. Salamone D, Barañao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, Prync A, Carbonetto C, Dabsys S, Munar C, Salaberry R, Berra G, Berra I, Fernández N, Papouchado M, Foti M, Judewicz N, Mujica I, Muñoz L, Alvarez SF, González E, Zimmermann J, Criscuolo M, Melo C: **High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow**. *J Biotechnol* 2006, **124**: 469-472.
5. Takanashi M, Keicho K, Takahashi ZH, Ogawa H, Schultz RM, Okano A: **Effect of oxidative stress on development and DNA damage *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay**. *Theriogenology* 1999, **54**: 137-145.
6. Lonergan P, Fair T: ***In vitro*-produced bovine embryos – Dealing with the warts**. *Theriogenology* 2008, **69**: 17-22.

7. Ziegler-Birling C, Helmrich A, Tora L, Torres-Padilla MET: **Distribution of p53 binding protein 1 (53BP1) and phosphorylated H2A.X during mouse preimplantation development in the absence of DNA damage.** *Int J Dev Biol* 2009, **53**: 1003-1011.
8. Fernandes-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A: **DNA damage-induced g2-m checkpoint activation by histone H2A.X and 53 bp1.** *Nat Cell Biol* 2003, **4**: 993-997.
9. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA: **Atm and DNA-pk function redundantly to phosphorylate h2ax after exposure to ionizing radiation.** *Cancer Res* 2004, **64**:2390-2396.
10. Zhou BB, Elledge SJ: **The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.** *Nature* 2000, **408**: 433-439.
11. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM: **DNA double-stranded breaks induce histone H2A.X phosphorylation on serine 139.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 5858-5868.
12. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W: **Histone H2A variants H2AX and H2AZ.** *Curr Opin Gen Dev* 2002, **12**: 162-169.
13. Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM: **Histone H2AX in DNA damage and repair.** *Cancer Biol Ther* 2003, **2**: 233-235.
14. Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A: **H2AX: the histone guardian of the genome.** *DNA Repair* 2004, **3**: 959-967.
15. Reina-San-Martin B, Difilippantonio S, Hanitsch L, Masilamani RF, Nussenzweig A, Nussenzweig MC: **H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation.** *J Exp Med* 2003, **197**: 1767-1778.
16. Adiga SK, Toyoshima M, Shimura T, Takeda J, Uematsu N, Niwa O: **Delayed and syage specific phosphorylation of H2A.X during preimplantation development of γ -irradiated mouse embryos.** *Reproduction* 2007, **133**: 415-422.
17. Brackett B, Oliphant G, 1975: **Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*.** *Biol Reprod* 1975, **12**: 260-274.
18. Oback B, Wiersema AT, Gaynor P: **Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system.** *Cloning Stem Cells* 2003, **5**: 3-12.
19. Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H: **New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system.** *Mol Reprod Dev* 2000, **55**: 256-264.

20. Beaujean N, Taylor JE, McGarry M, Gardner JO, Wilmut I, Loi P, Ptak G, Galli C, Lazzari G, Bird A, Young LE, Meehan RR: **The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA.** *Dev Biol* 2004, **101**: 7636-7640.
21. Park JS, Jeong YS, Shin ST, Lee KK, Kang YK: **Dynamic DNA Methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes.** *Dev Dynamics* 2007, **236**: 2523-2533.
22. Ward WS, Coffey DS: **DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells.** *Biol Reprod* 1991, **44**: 569-574.
23. Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C, Laurencon A, Karr TL, Couble P: **The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus.** *Nature* 2005, **437**: 1386-1390.
24. Sega GA, Sotomayor RE, Owens JG: **A study of unscheduled DNA synthesis induced by X-rays in the germ cells of male mice.** *Mutat Res* 1978, **49**: 239-257.
25. Kofman-Alfaro S, Chandley AC: **Radiation-initiated DNA synthesis in spermatogenic cells of the mouse.** *Exp Cell Res* 1971, **69**: 33-44.
26. Li E: **Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**: 662-673.
27. Bird A: **DNA methylation patterns and epigenetic memory.** *Gene Dev* 2002, **16**: 6-21.
28. Dean W, Walter J: **Epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Science* 2001, **293**: 1089-1093.
29. Meehan RR: **DNA methylation in animal development.** *Semin Cell Dev Biol* 2003, **14**: 53-65.
30. Nashum B, Yukawa N, Liu H, Akiyama T, Aoki F: **Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice.** *Development* 2010, **137**: 3785-3794.

Table 1: *In vitro* development of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF), parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT).

Embryo type	Cultured Embryos, <i>n</i>	Cleavage		Blastocyst	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
IVF	184	142/184	77.0 ^a	28/142	19.9 ^{a,b}
PA	350	264/350	75.1 ^a	82/264	31.0 ^a
SNCT	270	218/270	83.5 ^a	18/218	8.0 ^b

Within a column, values without a common superscript differed ($P < 0.05$).

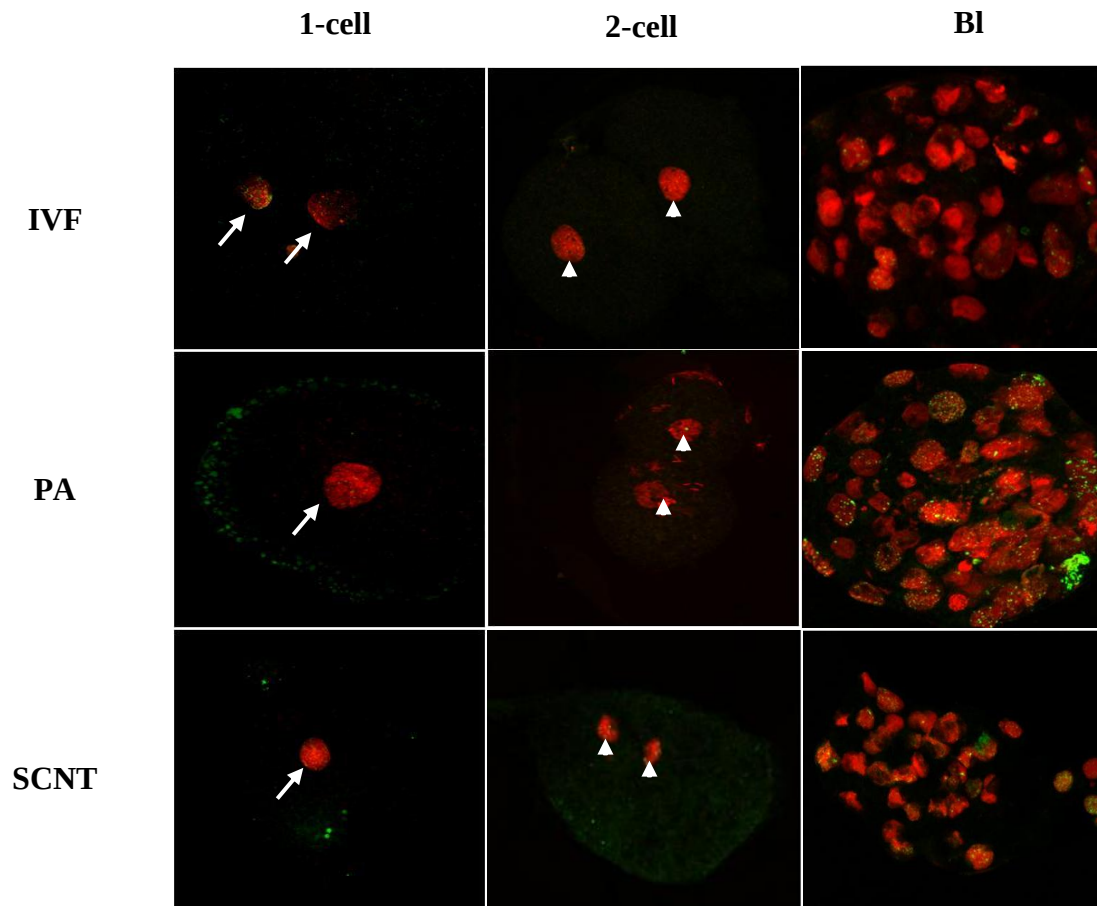


Figure 1. Representative confocal laser scanning micrographs of the γ H2A.X in bovine preimplantation zygotes and embryos. Data are presented for *in vitro* fertilization (IVF), parthenogenetically activated (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. The presented developmental stages include one-cell (1-cell) collected at 16 h after initial of the co-incubation spermatozoa-oocyte, oocyte activation and reconstructed zygotes, two-cell (2-cell) and blastocysts (Bl) recovered at 24 h and 7 days after initial of the *in vitro* culture in IVF, PA and SCNT embryos (original magnification X 200). Arrows indicate pronuclei in IVF and pronuclei-like nuclei in PA and SCNT 1-cell stages. Arrowheads indicate nuclei in IVF, PA and SCNT 2-cell stages.

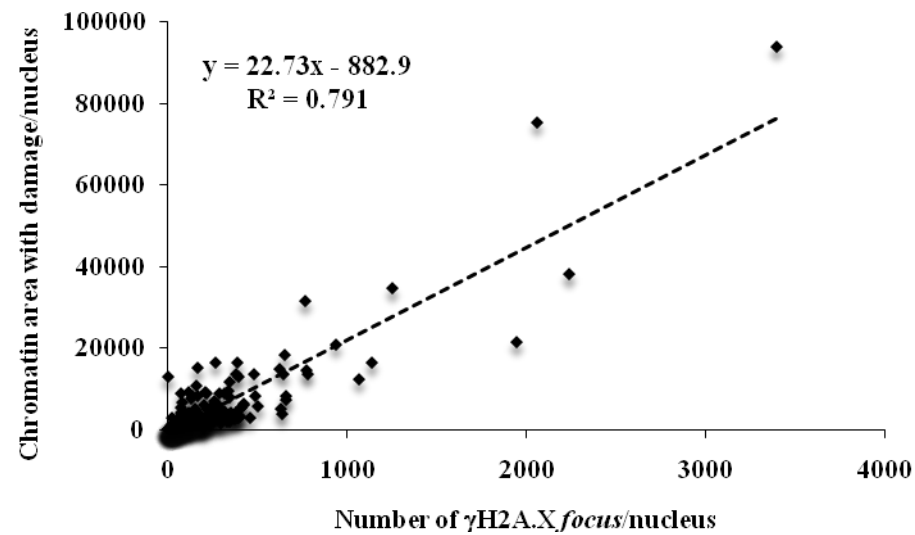


Figure 2. Linear regression between number of γ H2A.X *focus/nucleus* and chromatin area with damage/nucleus of all nucleus derived of bovine *in vitro* fertilized (IVF), parthenogenetically activated (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos.

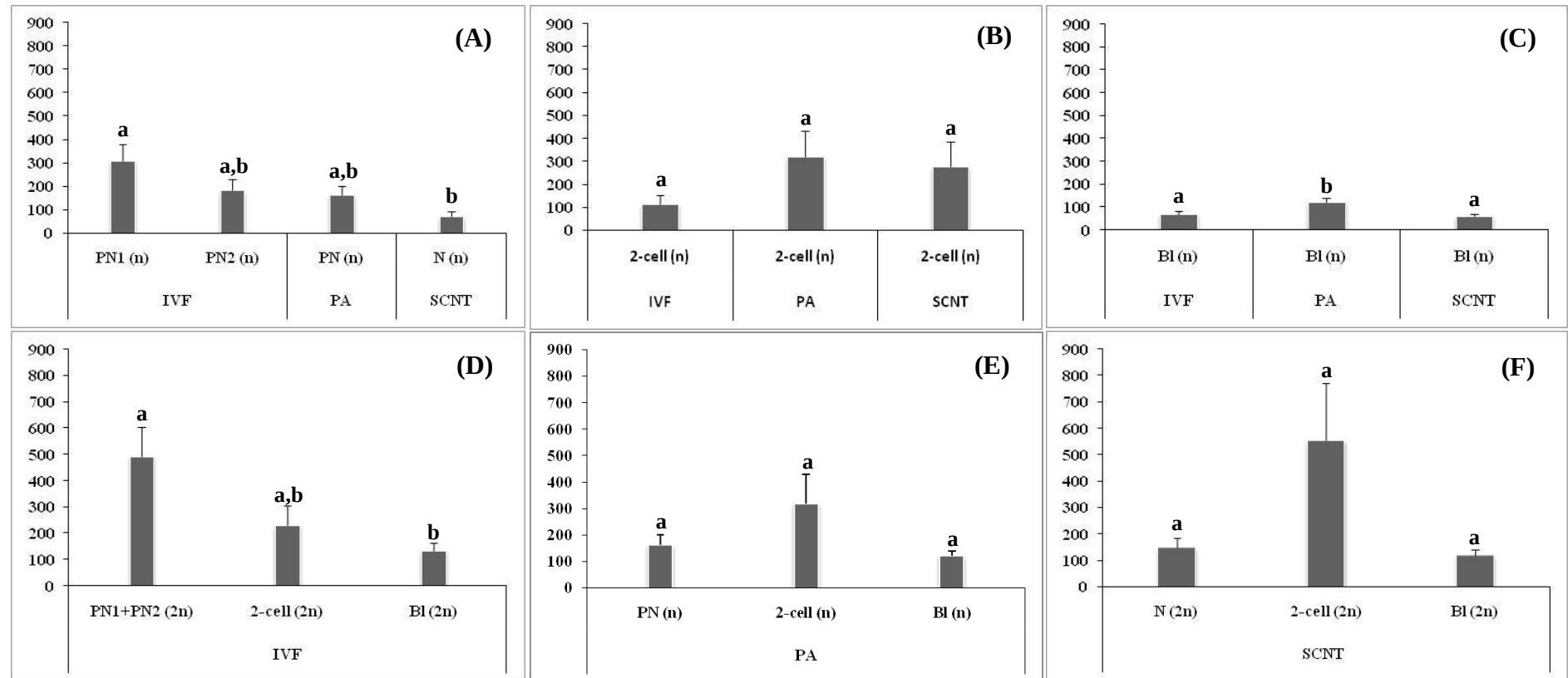


Figure 3. Number of γ H2A.X *focus* per nucleus in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF), parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). PN1 and PN2: pronuclear embryos; 2-cell: two cell embryos; Bl: blastocysts; (n) and (2n): nuclear ploidy. Within a figure, values without a common superscript differed ($P < 0.05$).

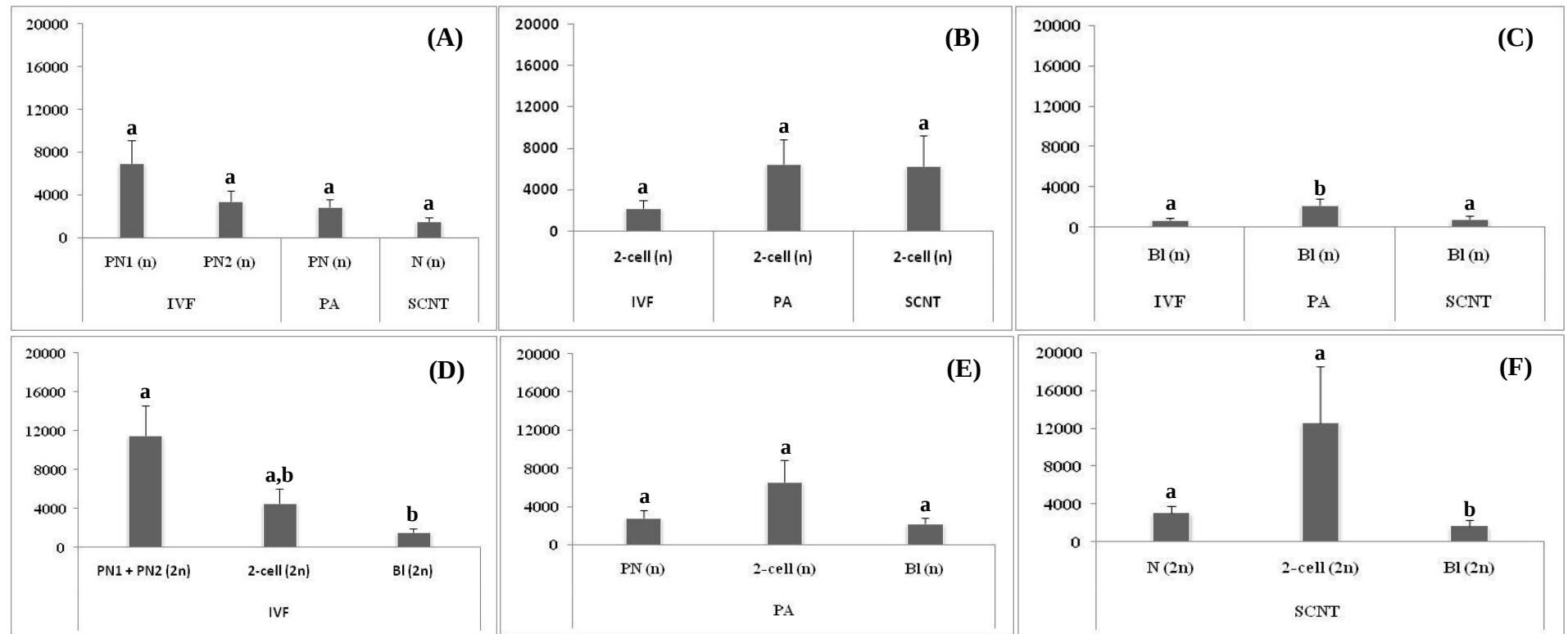


Figure 4. Chromatin with area damage per nucleus in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF), parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). PN1 and PN2: pronuclear embryos; 2-cell: two cell embryos; Bl: blastocysts; (n) and (2n): nuclear ploidy. Within a figure, values without a common superscript differed ($P < 0.05$).

8. CAPÍTULO III

PRODUCTION AND TRANSFER OF HANDMADE CLONED EMBRYOS USING SOMATIC CELLS FROM A TRANSGENIC GOAT

PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES CLONES POR HANDMADE CLONING (HMC) USANDO CÉLULAS SOMÁTICAS DE UM CAPRINO TRANSGÊNICO

Periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Qualis CAPES: B1.

(Submetido em: Outubro/2010)

Production and transfer of handmade cloned embryos using somatic cells from a transgenic goat

(Produção e transferência de embriões clones por Handmade Cloning (HMC) usando células somáticas de um caprino transgênico)

A.F. Pereira¹, K.C. Almeida¹, I.S. Carneiro², A.S. Alcântara Neto¹, S.R.G. Avelar¹, C. Feltrin², F.C. Sousa¹, C.H.S. Melo¹, R.R. Moura¹, D.I.A. Teixeira¹, L.R. Bertolini², V.J.F. Freitas¹, M. Bertolini²,

¹ Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Ceará State University (UECE)

² Molecular and Developmental Biology Laboratory, University of Fortaleza (UNIFOR)

Author for correspondence: Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Molecular/ Universidade de Fortaleza/ Fundação Edson Queiroz, Av. Washington Soares, 1321, Fortaleza-CE, Brazil. Tel: +55 85 34773067. Email address: mbertolini@ymail.com

ABSTRACT

Animal cloning represents a valuable tool for production of transgenic animals for proteins of pharmaceutical interest. Nevertheless, cloning by Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) procedures remain inefficient. Traditionally, SCNT is dependent of sophisticated equipment and a high level of technical skill. Recently, the handmade cloning (HMC) technique has simplified the cloning process. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* developmental potential of HMC-produced embryos using hG-CSF transgenic goat skin-derived donor cells. *Cumulus*-oocyte complexes from slaughterhouse ovaries were *in vitro*-matured for 20 h. Zona-free SCNT goat embryos were reconstructed by HMC, based on modified procedures from cattle. Cloned embryos were transferred to synchronous recipients on Day 1 (1-cell embryos) or on Day 7 (morulae/blastocysts) of *in vitro* culture. After all replications, the maturation rate was 83.2% (1,046/1,257), with a fusion rate of 81.0% (282/348) following embryo reconstruction. Cleavage rate was 87.3% (131/150), with 18.0% (27/150) and 12.7% (19/150) of reconstructed embryos developing to morulae and blastocysts, respectively. No recipient receiving reconstructed embryos were pregnant on Day 35. HMC appears to be an effective alternative for

the production of cloned transgenic goat embryos. Further studies are underway for the production of live born offspring.

Keywords: animal cloning, handmade cloning, transgenesis, goat.

RESUMO

A clonagem animal representa uma valiosa ferramenta para a produção de animais transgênicos para proteínas de interesse farmacêutico. Contudo, a clonagem por Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) continua sendo ineficiente. Tradicionalmente, a TNCS necessita de equipamentos sofisticados e habilidade técnica. Recentemente, a técnica de handmade cloning (HMC) simplificou o processo. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões produzidos por HMC utilizando células derivadas da pele de um caprino transgênico para o hG-CSF. Complexos *cumulus*-oócito de ovários de abatedouros foram maturados *in vitro* por 20 h. Embriões caprinos TNCS sem zona pelúcida foram reconstruídos por HMC, baseado nos procedimentos para bovinos. Embriões foram transferidos para receptoras no Dia 1 (embriões 1-célula) ou Dia 7 (mórulas/blastocistos). Após as repetições, a taxa de maturação foi de 83,2% (1046/1257) com uma taxa de fusão de 81,0% (282/348). A taxa de clivagem foi de 87,3% (131/150) com 18,0% (27/150) e 12,7% (19/150) de embriões desenvolvendo-se a mórulas e blastocistos, respectivamente. Nenhuma receptora recebendo embriões foi diagnosticada prenhe no 35º dia. A clonagem por HMC parece ser uma alternativa eficiente para a produção de embriões caprinos clones transgênicos. Estudos encontram-se em andamento visando o nascimento de crias.

Palavras-chave: clonagem animal, handmade cloning, transgênese, caprino.

INTRODUCTION

After the birth of the first cloned mammal using adult somatic cells as donor nucleus (Wilmut et al., 1997), Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) becomes a technique that has been successfully applied to a range of species as cattle (Cibelli et al., 1998), mice (Wakayama et al., 1998), goats (Baguisi et al., 1999) and pigs (Polajaeva et al., 2000). Animal production by cloning has been mainly exploited to study interactions between the nucleus and the cytoplasm

during differentiation, epigenetics and reprogramming, to produce large-scale numbers of genetically identical animals, and also for genetic conservation (Campbell et al., 2007).

Perhaps one of the most exciting and promising applications of the SCNT is the production and multiplication of transgenic animals for pharmaceutical purposes. Since 2006 (Freitas et al., 2007), our group has been producing mammary gland-directed hG-CSF (human Granulocyte Colony Stimulating Factor) expressing transgenic goats, having the current goal to expand the herd by means of cloning procedures. Although SCNT is being performed in many laboratories, successful application of the cloning technology is still difficult and demanding task due to many factors (Campbell et al., 2005).

Traditional SCNT procedures employ sophisticated pieces of equipment, ready-made expensive micropipettes, and require a high level of technical skill. On the other hand, the handmade cloning (HMC) technique has been developed exactly to circumvent the need of micromanipulators by using zona-free oocytes (Peura et al., 1998; Vajta et al., 2001). Although, the conventional micromanipulator-based embryo production has been a rather successful methodology (Lagutina et al., 2007), HMC procedures are considered a technology with equivalent efficiency to traditional SCNT, showing that it can be used as an alternative method for the generation of cloned offspring (Tecirlioglu et al., 2005). In goats, several attempts have been made to produce cloned (Lan et al., 2006) and transgenic offspring (Baguisi et al., 1999; Keefer et al., 2001) using the micromanipulator system, with only a group thus far having reported the production of goat blastocysts by the HMC method (Akshey et al., 2008; 2010). However, no detailed information is available to date on the application of a HMC technique to produce cloned transgenic goat embryos.

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* embryo developmental capacity of cloned transgenic goat embryos obtained by HMC procedures using skin somatic cells from an hG-CSF transgenic doe.

MATERIAL AND METHODS

All protocols used in the present study were approved by the Animal Ethics Committee of Ceará State University (CEUA/UECE, n° 09144595-7/50), in compliance with the Biosafety Technical National Committee (CTNBio, n° 0288/06). Initially, we evaluated the *in vitro* development of cloned transgenic embryos to hG-CSF by HMC method (four replications). Then, cloned transgenic 1-cell or morula/blastocyst stage embryos were transferred to

synchronous recipients (three replications). Except where otherwise indicated, all chemicals were from Sigma Chemical Company (St. Louis, USA).

Goat ovaries were collected from a local slaughterhouse and transported to the laboratory in saline at 30°C. *Cumulus*-oocyte complexes (COCs) were recovered by aspiration of ≥ 2 mm follicles using a 22-gauge needle (Watanabe, Brazil), which was connected to a flushing system (Biosystem Biocom, Brazil), with a vacuum pressure of 30 mmHg. Prior to *in vitro* maturation (IVM), oocytes were morphologically graded in GI to GIV based on cellular vestments and cytoplasmic uniformity (Almeida et al., 2010). Only GI to GIII COCs were *in vitro*-matured in TCM199 supplemented with 0.022 µg/mL sodium pyruvate, 10,000 IU penicillin, 10,000 µg/mL streptomycin sulfate, 25 µg/mL amphotericin B, 10% fetal calf serum-FCS, 10 ng/mL EGF, 5 µg/mL FSH, 10 µg/mL LH, 1 µg/mL 17β-estradiol and 100 µM cysteamine for 20 h at 38.5°C, 5% CO₂ and high humidity. Following IVM, *cumulus* cells were removed by successive pipetting and oocytes with a visible polar body (PB) were briefly exposed to 0.25% protease for zona pellucida removal, followed by a rinse in pure FCS and multiple washes in holding medium (HM: TCM199 with 0.022 µg/mL sodium pyruvate, 10,000 IU penicillin, 10,000 µg/mL streptomycin sulfate, 25 µg/mL amphotericin B, 10% fetal calf serum-FCS). Zona-free oocytes were immediately used for SCNT.

The preparation of recipient cytoplasts, donor cell cultures and nuclear transfer procedures by HMC were adapted from our procedures in cattle (Ribeiro et al., 2009; Gerger et al., 2010). Briefly, zona-free oocytes were hand-bisected in 2.5 µg/mL cytochalasin B with a disposable blade under a stereomicroscope. Then, hemi-oocytes were screened under UV light in 10 µg/mL bisbenzimidazole (Hoechst 33342) in HM for selection of enucleated hemi-cytoplasts. Donor nucleus cell were derived from primary skin cell cultures established from ear biopsies aseptically collected from an adult Canindé hG-CSF transgenic female goat donor obtained in 2008 in our laboratory (Freitas et al., 2010). Upon biopsy collection, the ear tissue was diced into 2 mm pieces and placed in 35-mm tissue culture dishes containing Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 0.22 mM sodium pyruvate, 26.2 mM sodium bicarbonate, 100 IU/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 0.25 µg amphotericin B/mL and 10% FCS. Dermal fibroblast-like cell cultures were established, expanded and maintained at 38.5°C, 5% CO₂, until needed for cloning.

After a brief exposure to phytohemagglutinin, cloned embryos were reconstructed by the adhesion of either one cytoplast (~85% cytoplasmic volume) or two hemi-cytoplasts (2 x 50% cytoplasmic volume), to a single fibroblast cell from culture dishes with cells between the 2nd and 4th passage and at high confluence (>95%). Reconstructed structures were electrofused

by two 1.1-kV/cm DC pulses for 5 μ s (~26 h post-IVM), after a brief exposure to a 7.0-V pre-fusion AC pulse in electrofusion medium (300 mM mannitol, 0.1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM HEPES, 0.01% PVA) in a micro fusion chamber 0.22 mm (Micro chamber, Eppendorf, Germany) coupled to an electrofusion apparatus (Multiporator, Eppendorf, Germany). Fusion was assessed within 60 to 90 min. Fused embryos were activated 2-3 h post-fusion in 5 μ M ionomycin in HM for 5 min, followed by an incubation in 2 mM 6-DMAP in modified SOFaa supplemented with 0.4% BSA + 2% FCS for 4 h. Activation initiated 27.5 h after the onset of IVM. All structures were *in vitro*-cultured in 300 μ L of modified SOFaa medium supplemented with 0.4% BSA + 2% FCS, under mineral oil. Cloned embryos were *in vitro*-cultured individually in microwells using the well-of-the-well (WOW) system, based on Vajta et al. (2000) and modified by Feltrin et al. (2006), at 38.5°C, in humidified air and 5% CO_2 , 5% O_2 and 90% N_2 for seven days.

Crossbreed goat recipients were estrus-synchronized using intravaginal sponges for 10 days associated with an injection of 400 UI of eCG and 75 μ g of d-cloprostenol at 8th day. Estrus was observed 24-48 h after the sponge removal. Successfully cloned transgenic 1-cell embryos and morulae/blastocysts were transferred one and seven days post-estrus, respectively. Prior to the embryo transfer (ET), the recipient goats were fasted and anesthetized as described by Freitas et al. (2007). A laparoscopic exploration was performed in order to confirm the presence of at least one recent ovulation. Cloned embryos were transferred using a TomCat catheter which was threaded into the oviduct or uteri according with embryo stage. All females were monitored after the procedures, and antibiotics and analgesics were administered according to approved procedures. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography 28-35 days following transfer, using a Falco 100 scanner (Pie Medical, The Netherlands) equipped with a transrectal 6-8 MHz linear array transducer.

All data were expressed as mean $\pm$ SEM of individual values obtained from replications. Cleavage and blastocyst rates were designed as percentage of cleavage embryos and blastocyst at Day 2 and 7 divided by reconstructed embryos in culture, respectively.

RESULTS

The mean COC recovery rate from slaughterhouse goat ovaries (Fig. 1A) was 82.5% after all replications (Tab. 1). The maturation rate, based on PB selection (Fig. 1B and 1C), was 83.2% (1,046/1,257). A total of 793 matured oocytes were submitted to zona removal by

protease (Fig. 1D), with 85.1% (793/945) survival rate. In all replications, fibroblast cells in culture presented a confluence of >95% (Fig. 1E).

A total of 61 (43.9%) and 79 (56.1%), and 21 (10.0%) and 152 (90.0%) embryos were reconstructed using ~85% or 2 x 50% final cytoplasmic volume schemes out of 139 and 209 reconstructed embryos in 1-cell stage (Day 1) and morulae/blastocysts (Day 7) to ET, respectively. Embryo types were mixed for activation.

Results for *in vitro* and *in vivo* embryo developmental potential are summarized in Tab. 2. Cleavage rate on Day 2 (Fig. 1G) and morula and blastocyst rates on Day 7 were 87.3%, 18.0% and 12.7%, respectively, with 27 compact morulae and 19 blastocysts produced (Fig. 1H). For *in vivo* embryo development, a total of 88 and 13 cloned transgenic 1-cell stage embryos and morulae/blastocysts were transferred into six recipients, respectively. No recipients receiving cloned embryos (Fig. 1F) were pregnant upon ultrasound examination.

DISCUSSION

Since the live birth of the first cloned mammal using adult mammal cells (Wilmut et al., 1997), SCNT has been used as a research tool for many groups around the world. Animal production by cloning represents an important application for the production of transgenic animals for pharmaceutical proteins, usually named biopharming. Despite many efforts, cloning continues to be inefficient, becoming even less effective when applied to other species rather than cattle. The variable results of reconstructed embryo production has exploited modifications and improvements in techniques used for cloning, which have brought about a number of effects depending upon the species, including the simplification of the procedures that seek ultimately the improving of survival after birth (Campbell et al., 2007). Recently, alternative cloning methods, such as the HMC, have simplified the cloning process, also decreasing the time and cost for training of personnel and for embryo production *per se*.

In general, the cloning efficiency in many species, such as goats, is directly dependent on multiple steps, with each of them potentially influencing the successful outcome. For the time being, pre- and postnatal deviations in development will continue as unpredictable consequences of SCNT, limiting the transfer of such technology to commercial applications (Bertolini et al., 2007). The present study reports the production of goat cloned transgenic embryos using the HMC technique. Thus, we evaluated the developmental competence of these embryos, initially evaluating the *in vitro* embryonic development for 7 days in the WOW system, based on

procedures in cattle, to later investigate the ability of embryos to develop *in vivo* after the transfer to synchronized goat female recipients.

In the present study, oocytes used to clone by HMC were matured for 20 h before being processed for enucleation. In general, the IVM process requires a period of around 24 h for its completion, although in caprine, a slightly longer period of 27 h has been observed (Cognie et al., 2004). Nevertheless, in cloning, as well as in HMC procedures, the beginning of embryonic reconstruction starts usually 20-21 h after IVM so that embryonic activation can occur 27h post-IVM. Thus, we verified a mean IVM rate similar to other research groups (Cognie et al., 2004).

For removal of zona pellucida, the enzymatic digestion is considered the preferred method for use in domestic livestock species. Interestingly, we observed that caprine oocytes appeared to be more sensitive to protease digestion, based on our previous experience in cattle (Ribeiro et al., 2009; Gerger et al., 2010). Consequently, in the present study, we used enzymatic digestion with protease at a concentration of 0.25%, differently of the 0.5% concentration used for bovine oocytes (Vajta et al., 2004; Gerger et al., 2010). Rates of survival following zona digestion and rates of development to the morula and blastocyst stages reflected well the effectiveness of the lower concentration of protease used in this study.

The use of demecolcine to promote protrusion cone-guided bisection resulted in a high rate of lysis after bisection (unpublished data). In addition, zona-free oocytes were bisected using 2.5 µg/mL cytochalasin B, which provided a higher survival after splitting than the standard 5.0 µg/mL concentration (unpublished data). Using procedures as described by Ribeiro et al. (2009) in cattle, the bisection of goat oocytes resulted in 82 cytoplasts and 231 hemi-cytoplasts (with ~85% and ~50% of the cytoplasmic volume) out of 648 matured oocytes. Thus, the PB-oriented bisection that results in ~85% cytoplasts improves the embryo yield after cloning by HMC, rendering it advantageous for species such as the goat, for which oocyte supply and numbers are usually limiting factors. Furthermore, fusion rates higher than 80% in this study were similar to other groups of investigators working with goats (Akshey et al., 2008; 2010).

In vitro culture is supposed to have a crucial impact on the development not only of *in vitro*-fertilized but also of SNCT embryos. The embryo culture system plays a significant role in determining the proportion of cloned embryo development to morula and blastocyst. Blastocyst rates observed in this study were equivalent to results obtained by Akshey et al. (2010) in goats (12.7% vs. 15.8%, respectively). In cattle, a blastocyst yield of about 50% was observed using the WOW system (Vajta, 2007). The WOW system provides a constant *in vitro* microenvironment for zona-free embryos due to its suitable size for holding the embryo, also avoiding the formation of chimeras when direct contact between individual zona-free embryos

occurs (Du et al., 2007). Moreover, the lack of zona pellucida as a result of HMC procedures does not affect neither the development to blastocysts (Rodríguez et al., 2008) nor the birth of cloned bovine, swine and mice (Vajta et al., 2004; Du et al., 2007; Ribas et al., 2005).

Pregnancies and liveborn have been reported in goat cloned embryos produced by conventional SNCT technique (Keefer et al., 2001; 2002). In this study, we also analyzed *in vivo* developmental competence of cloned embryos. Thus, 1-cell stage embryos and morulae/blastocysts were transferred to synchronous female recipients. The transfer at such an early stage usually requires the presence of zona pellucida or agar embedding to protect embryos from the recipient's immune system (Loi et al., 1999). A disadvantage of zona-free systems is that embryos have to reach at least the compact morula or early blastocyst stages *in vitro* to avoid disintegration in the oviduct without the protective layer of the zona pellucida (Du et al., 2005; Vajta et al., 2005). One of the functions of zona pellucida is to keep the interaction between cells during the first embryonic divisions. A study to evaluate the *in vivo* developmental viability of 1-cell stage porcine handmade cloned embryos showed that the transfer of these embryos directly to the oviduct of a synchronous sow without zona pellucida or agar embedding can result in pregnancy (Ohlweiler et al., 2010). However, here, no recipients receiving reconstructed cloned 1-cell stage embryos became pregnant. Moreover, few replications with blastocyst transfers were performed. In other works, zona-free blastocysts were transferred successfully, as in cattle (Peura et al., 1998; Vajta et al., 2004) and swine (Du et al., 2007), which have been born.

CONCLUSION

In summary, the use of HMC procedures was proven a simple and promising alternative for the production of cloned transgenic goat embryos. However, further studies are underway for the production of live born offspring.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP), CNPq and FINEP/MCT (RECODISA). Alexsandra Fernandes Pereira is a recipient of a scholarship from FUNCAP. Vicente José de Figueirêdo Freitas and Marcelo Bertolini are CNPq senior investigators.

REFERENCES

AKSKEY, Y.S.; MALAKAR, D.; De, A.K. et al. Hand-made cloned goat (*Capra hircus*) embryos - A comparison of different donor cells and culture systems. *Cel. Reprog.*, v.12, p.1-8, 2010.

AKSHEY, Y.S.; MALAKAR, D.; De, A.K. et al. Production of handmade cloned goat blastocysts using fibroblast cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.2, p.91-92, 2008.

ALMEIDA, K.C.; PEREIRA, A.F.; ALCÂNTARA NETO, A.S. et al. Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in *cumulus*-oocyte complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats. *Zygote (in press)*, 2010.

BAGUISI, A., BEHBOODI, E.; MELICAN, D.T. et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, v.17, p. 456-461, 1999.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R.; GERGER, R.P.C. et al. Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, p.391-405, 2007.

CAMPBELL, K.H.; ALBERIO, R.; CHOI, I. et al. Cloning: eight years after Dolly. *Reprod. Dom. Anim.*, v.40, p.256-268, 2005.

CAMPBELL, K.H.; FISHER, P.; CHEN, W.C. et al. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology*, v.68, p.14-31, 2007.

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J. et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, v.280, p.1256-1258, 1998.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y. et al. State of the art production, conservation and transfer of *in vitro* produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.16, p.437-445, 2004.

DU, Y.; KRAGH, P.M.; ZHANG, Y. et al. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. *Theriogenology*, v.68, p.1104-1110, 2007.

DU, Y.; KRAGH, P.M.; ZHANG, X. et al. Overall *in vitro* efficiency of porcine hand-made cloning (HMC) combining partial zona digestion and oocyte trisection with sequential culture. *Cloning Stem Cells*, v.7, p.199-205, 2005.

FELTRIN, C.; FORELL, F.; DOS SANTOS, L. et al. *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by handmade cloning using a modified WOW culture system. *Reprod. Fertil. Develop.*, v.18, p.126, 2006.

FREITAS, V.J.F.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.E. et al. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 79, p. 585-592, 2007.

FREITAS, V.J.F.; TEIXEIRA, D.I.A.; MELO, L.M. et al. Generation of transgenic naturalized goats producing human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) in Brazil. *Transgenic Res.*, v.19, p.146, 2010.

GERGER, R.P.C.; RIBEIRO, E.S.; FORELL, F. et al. *In vitro* development of cloned bovine embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. *Genet. Mol. Res.*, v.9, p.295-302, 2010.

KEEFER, C.L.; BALDASSARRE, H.; KEYSTON, R. et al. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro* matured oocytes. *Biol. Reprod.*, v.64, p.849-856, 2001.

KEEFER, C.L.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A. et al. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, v.66, p.199-203, 2002.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R. et al. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology*, v.67, p.90-99, 2007.

LAN, G.C.; CHANG, Z.L.; LUO, M.J. et al. Production of cloned goats by nuclear transfer of *cumulus* cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.73, p.834-840, 2006.

LOI, P.; BOYAZOGLU, S.; FULKA JR, J. et al. Embryo cloning by nuclear transfer: experiences in sheep. *Livest. Prod. Sci.*, v.69, p.281-294, 1999.

OHLWEILER, L.U.; MEZZALIRA, J.C.; MONACO, E. et al. Pregnancy outcome after oviductal transfer of zona-free 1-cell-stage porcine embryos produced by handmade cloning. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.22, p.194-195, 2010.

PEURA, T.T.; LEWIS, I.M.; TROUNSON, A.O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.*, v.50, p. 185-191, 1998.

POLEJAEVA, I.A.; CHEN, S.H.; VAUGHT, T.D. et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, v.404, p.86-90, 2000.

RIBAS, R.; OBACK, B.; RITCHIE, W. et al. Development of a zona-free method of nuclear transfer in the mouse. *Cloning Stem Cells*, v. 7, p. 126-138, 2005.

RIBEIRO, E.S.; GERGER, R.P.; OHLWEILER, L.U. et al. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning Stem Cells*, v.11, p.377-386, 2009.

RODRÍGUEZ, L.; NAVARRETE, F.I.; TOVAR, H. et al. High developmental potential *in vitro* and *in vivo* of cattle embryos cloned without micromanipulators. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.25, p.13-16, 2008.

TECIRLIOGLU, R.T.; COONEY, M.A.; LEWIS, I.M. et al. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.17, p.573-585, 2005.

VAJTA, G. Handmade cloning: the future way of nuclear transfer. *Trends Biotechnol.*, v.25, p.250-253, 2007.

VAJTA, G.; KRUGH, P.M.; MTANGO, N.R. et al. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.17, p.91-112, 2005.

VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; HYTTTEL, P. et al. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*, v.3, p.89-91, 2001.

VAJTA, G.; PEURA, T.T.; HOLM, P. et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev.*, v.55, p. 256-264, 2000.

VAJTA, G.; PEURA, T.T.; LAI, L. et al. Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning (HMC) in cattle and pig. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.16, p.159, 2004.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A.C.; ZUCCOTTI, M. et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with *cumulus* cell nuclei. *Nature*, v.394, p.369-374, 1998.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; McWHIR, J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.

Table 1. Number of aspirated follicles and recovery and maturation rates for goat *cumulus*-oocyte complexes (COCs) obtained from slaughterhouse ovaries.

IVC + ET	Ovaries	Punctured	Recovered		Oocyte quality						IVM rate		
		Follicles	COCs		I and II		III		IV		Immature oocytes	MII	
	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	<i>n</i>	%
Day 1 + ET	50	374	349	93.3	168	48.1	111	31.8	24	6.9	321	268	83.5
Day 7 + ET	111	981	914	93.2	355	38.8	421	46.1	138	15.1	907	710	78.3
<i>Total</i>	161	1355	1263	93.2	523	41.4	532	42.1	162	12.8	1257	1046	83.2

Table 2. *In vitro* e *in vivo* development of hG-CSF (human Granulocyte Colony Stimulating Factor) transgenic goat embryos produced by handmade cloning (HMC).

IVC + ET	Reconstructed embryos, <i>n</i>	Fusion rate [†]		Cleavage		Morulae		Blastocyst		ET	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	n/recipient	Pregnancy
Day 1+ET	139	109	78.4	--	--	--	--	--	--	88/5	0
Day 7+ET	209	171	81.8	131/150	87.3	27/150	18.0	19/150	12.7	13/1 ^{††}	0
<i>Total</i>	348	282	81.0	131/150	87.3	27/150	18.0	19/150	12.7	101/6	0

[†] Fusion of one hemi-cytoplasm (85%) + donor cell or two hemi-cytoplasts (2 x 50%) + donor cell.

^{††} Transfer of seven compact morulae and six blastocysts.

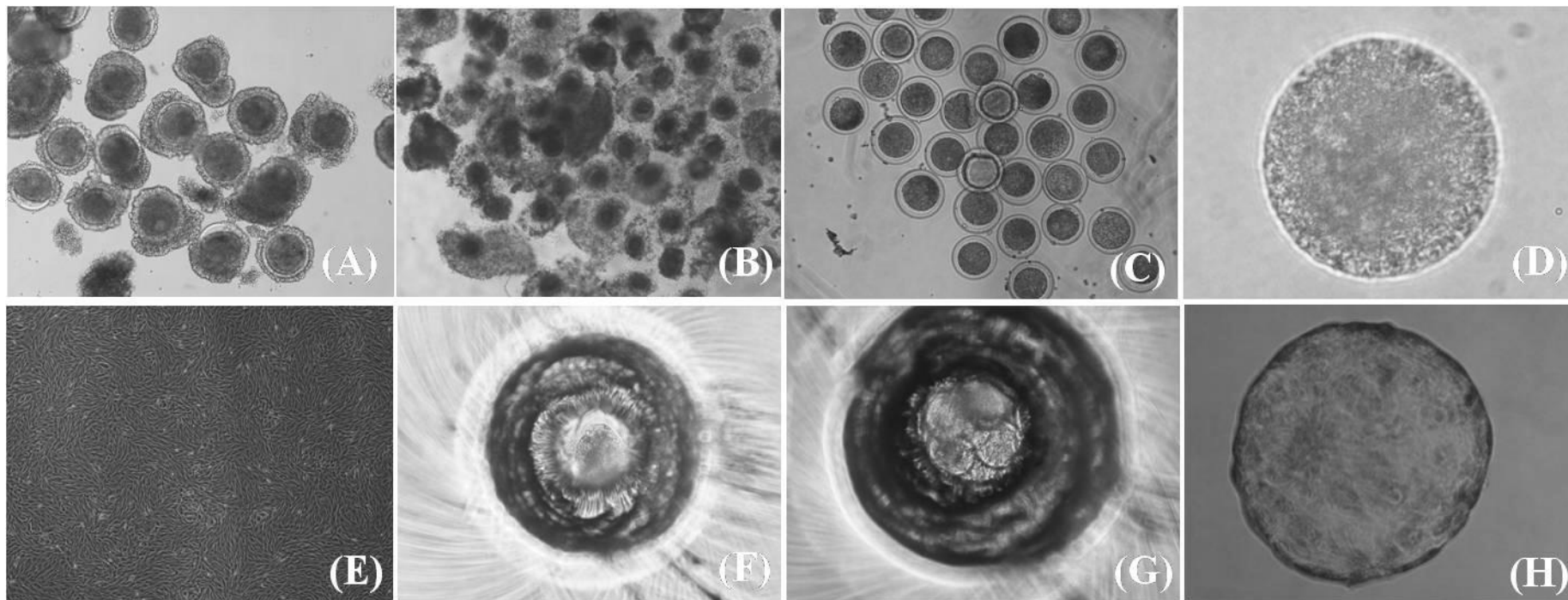


Figure 1. Cloned hG-CSF transgenic goat embryos produced by the HMC method. **(A).** Immature COCs from slaughterhouse ovaries prior to IVM (original magnification X 200). **(B).** COCs in modified HM after 20 h IVM (original magnification X 200). **(C).** Matured oocytes based on PB selection. **(D).** Zona-free oocyte obtained by enzymatic removal (original magnification X 600). **(E).** Fibroblast cells in high confluence originally cultured from a Canindé transgenic female (original magnification X 200). **(F).** One cell embryo before the transfer to synchronized recipients (original magnification X 400). **(G).** Cloned transgenic embryos on Day 2 in the WOW system (original magnification X 400). **(H).** Blastocyst on the seventh day of development (original magnification X 600).

9. CONCLUSÕES

9.1. CAPÍTULO I

- Em caprinos, CCOs produzidos pelos tratamentos padrão e dose única foram diferentes quanto à expressão de EGF e EGFR;
- Após a maturação *in vitro*, obsevou-se um aumento da expressão de EGFR em oócitos e células do *cumulus*;
- Tais resultados permitiram obter um cenário molecular de como os fatores podem ser avaliados no oócito após pré-maturação *in vivo* e maturação *in vitro*, e que podem influenciar o sucesso das biotecnologias;

9.2. CAPÍTULO II

- Em embriões bovinos pré-implatacionais, blastocistos produzidos por FIV, AP e TNCS diferiram quanto à presença de γ H2A.X. O número maior de *focus* de γ H2A.X detectado em blastocistos partenos refletiu na alta taxa de desenvolvimento embrionário verificada neste grupo, quando comparada aos demais (FIV e TNCS);
- Os núcleos de embriões clones no estágio de 1-célula apresentaram maior número de *focus* de γ H2A.X quando comparados ao pró-núcleo 1 (tamanho maior) de embriões de FIV 1-célula;

9.3. CAPÍTULO III

- O uso da técnica de HMC mostrou ser uma alternativa simples e promissora para a produção de embriões transgênicos utilizando células de um caprino transgênico adulto.

10. PERSPECTIVAS

As investigações realizadas neste trabalho permitiram conhecer e contribuir para o estudo da TNCS em ruminantes. A TNCS é uma biotécnica multifatorial e os progressos em todas as suas etapas contribuem para simplificar e aumentar sua eficiência. Contudo, estudos ainda tornam-se necessários, quanto:

- (i) Investigar os níveis de expressão de EGF e EGFR em oócitos e células do *cumulus* após maturação *in vitro* em meio suplementado com hormônios e fatores de crescimento;
- (ii) Avaliar a competência de desenvolvimento *in vitro* de oócitos caprinos recuperados por laparoscopia dos distintos tratamentos hormonais;
- (ii) Elucidar os mecanismos de reparo aos danos ao DNA em embriões bovinos pré-implantacionais oriundos de manipulação *in vitro*, permitindo conhecer e corrigir falhas durante a reprogramação nuclear;
- (iii) Estabelecer taxas de prenhez e obter caprinos transgênicos clones viáveis produzidos por HMC utilizando células de um caprino transgênico.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYDEERA, L.R. *In vitro* production of embryos in swine. **Theriogenology**, 57, 257-273, 2002.
- ADASHI, E.Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal of Reproduction and Immunology**, 39, 13-19, 1998.
- ADIGA, S.K.; TOYOSHIMA, M.; SHIMURA, T.; TAKEDA, J.; UEMATSU, N.; NIWA, O. Delayed and syage specific phosphorylation of H2A.X during preimplantation development of γ -irradiated mouse embryos. **Reproduction**, 133, 415-422, 2007.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**, 40, 183-197, 1989.
- AKSKEY, Y.S.; MALAKAR, D.; De, A.K.; MANOJ, K.J.; GARG, S.; DUTTA, R.; PAWAR, S.K.; MUKESH, M. Hand-made cloned goat (*Capra hircus*) embryos - A comparison of different donor cells and culture systems. **Cellular Reprogramming**, 12, 1-8, 2010.
- AKSHEY, Y.S.; MALAKAR, D.; De, A.K. Production of handmade cloned goat blastocysts using fibroblast cells. **Reproduction, Fertility and Development**, 2, 91-92, 2008.
- ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECCCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, 121, 647-653, 2001.
- ALI, A.; SIRARD, M.A. The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. **Zygote**, 10, 65-71, 2002.
- ALMEIDA, K.C.; PEREIRA, A.F.; ALCÂNTARA NETO, A.S.; AVELAR, S.R.G.; BERTOLINI, L.; BERTOLINI, M.; FREITAS, V.J.F.; MELO, L.M. Real-time qRT-PCR analysis of EGF receptor in *cumulus*-oocyte complexes recovered by laparoscopy in hormonally treated goats. **Zygote (in press)**, 2010.

ARAT, S.; GIBBONS, J.; RZUCIDLO, S.J.; RESPESS, D.S.; TUMLIN, M.; STICE, S.L. *In vitro* development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. **Biology of Reproduction**, 66, 1768-1774, 2002.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular, Reproduction and Development**, 37, 335-344, 1994.

ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S.; SIRARD, M.A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate *in vitro*. **Biology of Reproduction**, 79, 209-222, 2008.

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. **Nature Biotechnology**, 17, 456-461, 1999.

BALDASSARRE, H.; DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; CASTRO, T.E.; CABRERA FISCHÉ, E.I. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, 35, 145-150, 1994.

BALDASSARRE, H.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; PESSI, H. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculogenesis alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, 45, 707-717, 1996.

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 and Stem Cells**, 5, 279-285, 2003.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic *ovum pick-up* and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, 57, 275-284, 2002.

BARIL, G. Seleção e criopreservação de embriões caprinos e ovinos. In: FREITAS, V.J.F. (Ed.). **Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. Fortaleza: Multicor, 2006. p.21-29.

BEHBOODI, E.; CHEN, L.; DESTREMPES, M.M.; MEADE, H.M.; ECHELARD, Y. Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins. In: CIBELLI, J.; LANZA, R.P.; CAMPBELL, K.H.S.; WEST, M.D. (Ed.). **Principles of cloning**. New York: Academic Press, 2002. p.459-472.

BERARDINO, M.A. Origin and progress of nuclear transfer in nonmammalian animals. In: VERMA, P.J.; TROUNSON, A.O. **Nuclear transfer protocols-cell reprogramming and transgenesis**. 1^a ed. Ed. Humana Press: Nova Jersey, 2006, cap. 1, p. 3-34.

BERG, D.K.; LI, C.; ASHER, G.; WELLS, D.N.; OBACK, B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. **Biology of Reproduction**, 77, 384-394, 2007.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G.B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, 57, 181-187, 2002

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R.; GERGER, R.P.C.; BATCHELDER, C.A.; ANDERSON, G.B. Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31, 391-405, 2007.

BHOJWANI, S.; VAJTA, G.; CALLESEN, H.; ROSCHLAU, K.; KUWER, A.; BECKER, F.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. Developmental competence of HMC™ derived bovine cloned embryos obtained from somatic cell nuclear transfer of adult fibroblasts and granulose cells. **Journal of Reproduction and Development**, 51, 465-475, 2005.

BLONDIN, P.; FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. *In vitro* production of embryos alters levels of insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acid in bovine fetuses 63 days after transfer. **Biology of Reproduction**, 62, 384-389, 2000.

BONNET, A.; DALBIÈS-TRAN, R.; SIRARD, M.A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**, 135, 119-128, 2008.

BORDIGNON, V.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D.; SMITH, L.C. GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. **Theriogenology**, 48, 291-298, 1997.

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, 49, 29-36, 1998.

BRASAEMLE, D.L.; HANSEN, J.C. Developmental biology: holding pattern for histones. **Current Biology**, 16, 29-36, 2006.

BRIGGS, R.; KING, T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs eggs. **Proceedings of National Academic Science**, 38, 455-461, 1952.

BROMHALL, J.D. Nuclear transplantation in the rabbit egg. **Nature**, 258, 719-162, 1975.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, 43, 543-547, 1990.

CAMPBELL, K.H.S.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R.D.W.; LEE, J.H.; MAALOUF, W. Cloning: eight years after Dolly. **Reproduction in Domestic Animal**, 40, 256-268, 2005.

CAMPBELL, K.H.S.; FISHER, P.; CHEN, W.C.; CHOI, I.; KELLY, R.D.W.; LEE, J.H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. **Theriogenology**, 68, 214-231, 2007.

CAMPBELL, K.H.S.; McWHIR, J.; RITCHIE, W.A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, 380, 64-66, 1996.

CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal growth factor. **Journal of Biology and Chemistry**, 265, 7709-7712, 1990.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LEBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Clinical, hormonal and hematological characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of Reproduction**, 66, 1596-1603, 2002.

CHESNÉ, P. Métodos de clonagem em caprinos e ovinos. In: FREITAS, V.J.F. (Ed). Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem). Fortaleza: Multicor, 2006. p.21-29.

CHESNÉ, P.; PERREAU, C.; LAVERGNE, Y.; POULIN, N.; BARIL, G.; CAPO, D.; BOUTTIER, A.; ROUGHÉL, C.; COGNIÉ, Y.; VIGNON, X.; MERMILLOD, P.; HEYMAN, Y. Birth of live offspring from cultured transferred embryos in goats. In: **19th Science Meet European Embryo Transfer Association**, 144, 2003.

CHOI, J.H.; CHOI, K.C.; AUERSPERG, N.; LEUNG, P.C. Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen activated protein kinases and phosphatidyl-inositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. **Endocrine-Related Cancer**, 12, 407-421, 2005.

CIBELLI, J.B.; STICE, S.L.; GOLUEKE, P.J.; KANE, J.J.; JERRY, J.; BLACKWELL, C.; PONDE DE LEON, A.; ROBL, J. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. **Science**, 280, 1256-1258, 1998.

COCERO, M.J.; ALABART, J.L.; HAMMAMI, S.; MARTÍ, J.I.; LAHOZ, B.; SÁNCHEZ, P.; ECHEGOYEN, E.; BECKERS, J.F.; FOLCH, J. The efficiency of *in vitro* ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. **Reproduction in Domestic Animal** (*in press*), 2010.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State of the art production, conservation and transfer of *in vitro* produced embryos in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, 16, 437-445, 2004.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Cysteamine improves *in vitro* goat oocyte maturation in defined medium. In: **Proceedings of the 18th Meeting Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)**, 154, 2002.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, 20, 715-723, 2006.

COTICCHIO, G.; ROSSI, G.; BORINI, A.; GRONDAHL, C.; MACCHIARELLI, G.; FLAMIGI, C.; FLEMING, S.; CECCOCI, S. Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion *in vitro* are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. **Human Reproduction**, 19, 2913-2918, 2004.

CROSIER, A.E.; FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; BLONDIN, P.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, P.W. Development of skeletal muscle and expression of candidate genes in bovine fetuses from embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, 67, 401-408, 2002.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, 103, 293-298, 1981.

DAS, K.; PHIPPS, W.R.; HENSLEIGH, H.C.; TAGATZ, G.E. Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation *in vitro*. **Fertility and Sterility**, 57, 895-901, 1992.

DAS, K.; STOUT, L.E.; HENSLEIGH, H.C.; TAGATZ, G.E.; PHIPPS, W.R.; LEUNG, B.S. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. **Fertility and Sterility**, 55, 1000-1004, 1991.

DE LA FUENTE, R.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. **Human Reproduction**, 14, 3060-3068, 1999.

DE SOUSA, P.A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG L.E.; WALKER S.K.; WILMUT I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of Reproduction**, 65, 23-30, 2001.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T.A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B.M.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of preimplantation embryos. **Theriogenology**, 57, 5-20, 2002.

DO, J.T.; HONG, K.H.; LEE, B.Y.; KIM, S.B.; LEE, H.T; CHUNG, K.S. *In vitro* development of reconstructed bovine embryos and fate of donor mitochondria following nuclear injection of *cumulus* cells. **Zygote**, 9, 211-218, 2001.

DOWNS, S.M.; DANIEL, S.A.J.; EPPIG, J.J. Induction of maturation in *cumulus* cell-enclosed mouse oocytes by follicle stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. **Journal of Experimental Zoology**, 245, 86-96, 1988.

DU, Y.; KRAGH, P.M.; ZHANG, Y.; LI, J.; SCHMIDT, M.; BOGH, I.B.; ZHANG, X.; PURUP, S.; JORGENSEN, A.L.; PEDERSEN, A.M.; VILLEMOES, K.; YANG, H.; BOLUND, L.; VAJTA, G. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. **Theriogenology**, 68, 1104-1110, 2007.

DU, Y.; KRAGH, P.M.; ZHANG, X. et al. Overall *in vitro* efficiency of porcine hand-made cloning (HMC) combining partial zona digestion and oocyte trisection with sequential culture. **Cloning and Stem Cells**, 7, 199-205, 2005.

EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, 208, 349-51, 1965.

ENRIGHT, B.; TANEJA, M.; SCHREIBER, D.; RIESEN, D.; TIAN, X.V.; FORTUNE, J.E.; YANG, X. Reproduction characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, 66, 291-296, 2002.

FAIR, T.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MURPHY, M.; RIZOS, D.; MARTIN, F.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Search for the bovine homolog of the murine *ped* gene and characterization of its messenger RNA expression during bovine preimplantation development. **Biology of Reproduction**, 70, 488-494, 2004.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.J.; HYTTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, 46, 208-215, 1997.

FAAST, R.; THONGLAIROAM, V.; SCHULZ, T.C.; BEALL, J.; WELLS, J.R.; TAYLOR, H.; MATTHAEI, K.; TREMETHICK, D.J.; LYONS, I. Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. **Current Biology**, 11, 1183-1187, 2001.

FELTRIN, C.; FORELL, F.; DOS SANTOS, L.; RODRIGUEZ, J.L. *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by handmade cloning using a modified WOW culture system. **Reproduction, Fertility and Development**, 18, 126, 2006.

FERNANDES-CAPETILLO, O.; CHEN, H.T.; CELESTE, A.; WARD, I.; ROMANIENKO, P.J.; MORALES, J.C.; NAKA, K.; XIA, Z.; CAMERINI-OTERO, R.D.; MOTOYAMA, N.; CARPENTER, P.B.; BONNER, W.M.; CHEN, J.; NUSSENZWIG, A. DNA damage-induced g2-m checkpoint activation by histone H2A.X and 53 bp1. **Nature Cell Biology**, 4, 993-997, 2003.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, 71, 836-848, 2009.

FILLINGHAM, J.; KEOGH, M.C.; KROGAN, N.J. GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. **Biochemistry and Cell Biology**, 84, 568-577, 2006.

FISSORE, R.A.; LONG, C.R.; DUNCAN, R.P.; ROBL, J.M. Initiation and Organization of Events during the first cell cycle in mammals: applications in cloning. **Cloning**, 1, 88-100, 1999.

FOLCH, J.; COCERO, M.J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J.L.; DOMINGUEZ, V.; COGNIÉ, Y.; ROCHE, A.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍ, J.I.; SÁNCHEZ, P.; ECHEGOYEN, E.; BECKERS, J.F.; SÁNCHEZ BONASTRE, A.; VIGNON, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. **Theriogenology**, 71, 1026-1034, 2009.

FORSBERG, E.J.; STRELCHENKO, N.S.; AUGENSTEIN, M.L.; BETTHAUSER, J.M.; LANGE, G.I.; MALLON, K.S.; BISHOP, M.M. Production of cloned cattle from *in vitro* systems. **Biology of Reproduction**, 67, 327-333, 2001.

FREITAS, V.J.F. Transgênese em caprinos. In: FREITAS, V.J.F. (Ed.). Produção de embriões por transferência nuclear (clonagem). Fortaleza: Multicor, 2006. p.61-70.

FREITAS, V.J.F.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.E.; DVORYANCHIKOV, G.A.; LOPES-JUNIOR, E.S.; TEXEIRA, D.I.A.; DIAS, L.P.B.; AVELAR, S.R.G.; MOURA, R.M.; 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. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 79, 585-592, 2007a.

FREITAS, V.J.F.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.E.; SEROV, O.L. Estado da arte na produção de caprinos transgênicos e clonados. **Acta Science Veterinary**, 35, 899-904, 2007b.

FREITAS, V.J.F.; TEIXEIRA, D.I.A.; MELO, L.M.; LOPES JUNIOR, E.S.; MOURA, R.R.; PEREIRA, A.F.; SOUSA, F.C.; ALMEIDA, K.C.; AVELAR, S.R.G.; CAJAZEIRAS, J.B.; DIAS, L.P.B.; DVORYANCHIKOV, G.A.; ANDREEVA, L.E.; SEROVA, I.A.; SEROV, O.L. Generation of transgenic naturalized goats producing human granulocyte-colony stimulating factor (hG-CSF) in Brazil. **Transgenic Research**, 19, 146, 2010.

GALL, L.; BOULESTEIX, C.; RUFFINI, S.; GERMAIN, G. EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat *cumulus* cells during *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, 71, 489-494, 2005.

GALL, L.; CHENE, N.; DAHIREL, M.; RUFFINI, S.; BOULESTEIX, C. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat *cumulus*–oocyte complex. **Molecular Reproduction and Development**, 67, 439-445, 2004.

GALLI, C.; DUCHI, R.; MOOR, R.M.; Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning**, 1, 161-170, 1999.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Revue Scientifique et technique**, 24, 413-423, 2005.

GAO, T.; ZHENG, J.; XING, F.; FRANG, H.; SUN, F.; YAN, A.; GONG, X.; DING, H.; TANG, F.; SHENG, H.Z. Nuclear reprogramming: the strategy used in normal development is also used in somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. **Cell Research**, 17, 135-150, 2007.

GAVIN, W.; BUTLER, R.; HAWKINS, N.; CHEN, L.H.; HAYDEN, E.; PICARELLA, M.; MELICAN, D. Comparison of enucleation methods for the production of transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, 59, 254, 2003.

GERGER, R.P.C.; RIBEIRO, E.S.; FORELL, F.; BERTOLINI, L.R.; RODRIGUES, J.L.; AMBRÓSIO, C.E.; MIGLINO, M.A.; MEZZALIRA, A.; BERTOLINI, M. *In vitro* development of cloned bovine embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. **Genetic and Molecular Research**, 9, 295-302, 2010.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, 67, 6-15, 2007.

GOOSSENS, K.; VAN POUCKE, M.; VAN SOOM, A.; VANDESOMPELE, J.; VAN ZEVEEREN, A.; PEELMAN, L.J. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology**, 5, 27, 2005.

GOSPODAROWICZ, D.; BIALECKI, H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. **Endocrinology**, 104, 757-764, 1979.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 33, 82-94, 2009.

GOVIN, J.; ESCOFFIER, E.; ROUSSEAU, S.; KUHN, L.; FERRO, M.; THEVENON, J.; CATENA, R.; DAVIDSON, I.; KHOCHBIN, S.; CARON, C. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. **Journal of Cell Biology**, 176, 283-294, 2007.

GULER, A., POULIN, N., MERMILLOD, P., TERQUI, M., COGNIE, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, 54, 209-218, 2000.

GURDON, J.B.; UEHLINGER, V. Fertile intestine nuclei. **Nature**, 210, 1240-1241, 1966.

HAGHIGHT, N.; VAN WINKLE, L.J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocyte that depends on intact gap junctions and transport system. **Journal of Experimental Zoology**, 253, 71-82, 1990.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA: damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS letter**, 281, 9-19, 1991.

HAN, Y.M.; KANG, Y.K.; KOO, D.B.; LEE, K.K. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, 59, 33-44, 2003.

HATOYA, S.; SUGIYAMA, Y.; NISHIDA, H.; OKUNO, T.; TORII, R.; SUGIURA, K.; KIDA, K.; KAWATE, N.; TAMADA, H.; INABA, T. Canine oocyte maturation in culture: significance of estrogen and EGF receptor gene expression in *cumulus* cells. **Theriogenology**, 71, 560-567, 2009.

HAYES, O.; RODRIGUEZ, L.L.; GONZÁLEZ, A.; FALCÓN, V.; AGUILAR, A.; CASTRO, F.O. Effect of cryopreservation on fusion efficiency and *in vitro* development into blastocysts of bovine cells lines used in somatic cell cloning. **Zygote**, 13, 277-282, 2005.

HAY-SCHMIDT, A.; VIUFF, D.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Transcriptional activity in *in vivo* developed early cleavage stage bovine embryos. **Theriogenology**, 56, 167-176, 2001.

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

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Frequency and occurrence of late gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, 66, 6-13, 2002.

HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LAZZARI, G.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIGNON, X. Zootechnical performance of cloned cattle and offsprings: preliminary results. **Cloning and Stem Cells**, 6, 111-120, 2004.

HILL, J.R.; WINGER, Q.A.; BURGHARDT, R.C.; WESTUSIN, M.E. Bovine nuclear transfer embryo using cells derived from a cloned fetus. **Animal Reproduction Science**, 68, 17-26, 2001.

HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411, 366-374, 2001.

HSIEH, M.; ZAMAH, M.; CONTI, M. Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. **Seminars in Reproductive Medicine**, 27, 52-61, 2009.

HSU, C.J.; HOLMES, S.D.; HAMMOND, J.M. Ovarian epidermal growth factor activity, concentration in porcine follicular fluid during follicular enlargement. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 147, 242-247, 1987.

HUNTER, M.G.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**, 82-83, 461-477, 2004.

HYTTER, P.; LAURINCIK, J.; OVERSTROM, E.W. Nucleolar protein allocation and ultrastructure in bovine embryos produced by nuclear transfer from embryonic cells. **Cloning**, 3, 69-82, 2001.

IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D.F.; OVERSTROM, E.W. Demecolcina-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning coordination between cell-stage egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. **Biology of Reproduction**, 68, 1249-1258, 2003.

KATO, Y.; TANI, T.; SOTOMARU, Y.; KUROKAWA, K.; KATO, J.; DOGUCHI, H.; YASUE, H.; TSUNODA, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science**, 282, 2095-2098, 1998.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, 120, 231-237, 2000.

KEEFER, C.L.; BALDASSARRE, H.; KEYSTON, R.; WANG, B.; BHATIA, B.; BILODEAU, A.S.; ZHOU, J.F.; LEDUC, M.; DOWENEY, 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. **Biology of Reproduction**, 64, 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. **Biology of Reproduction**, 66, 199-203, 2002.

KIM, N.H.; CHO, S.K.; CHOI, S.H.; KIM, E.Y.; PARK, S.; PILLIM, J.H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes *in vitro* maturation. **Zygote**, 8, 25-32, 2000.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. *In vitro* maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Science**, 73, 129-40, 2002.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, 62, 292-302, 2000.

KUBOTA, C.; YAMAKUCHI, H.; TODOROKI, J.; MIZOSHITA, K.; TABARA, N.; BARBER, M.; YANG, X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, 97, 990-995, 2000.

LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; DUCHI, R.; TURINI, P.; TESSARO, I.; BRUNETTI, D.; COLLEONI, S.; CROTTI, G.; GALLI, C. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. **Theriogenology**, 67, 90-98, 2007.

LAN, G.C.; CHANG, Z.L.; LUO, M.J.; JIANG, Y.L.; HAN, D.; WU, Y.G. Production of cloned goats by nuclear transfer of *cumulus* cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 73, 834-840, 2006.

LANZA, R.P.; CIBELLI, J.B.; FABER, D.; SWEENEY, R.W.; HENDERSON, B.; NAVALA, W.; WEST, M.D.; WETTSTEIN, P.J. Cloned cattle can be normal and healthy. **Science**, 294, 1893-1894, 2001.

LANZA, R.P.; CIBELLI, J.B.; MORAES, C.T.; FARIN, P.W.; FARIN, C.E.; HAMMER, M.; WEST, M.D.; DAMIANI, P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning**, 2, 79-90, 2000.

LEE, S.H.; KUMAR, B.M.; KIM, J.G.; OCK, S.A.; JEON, B.G.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S.Y.; RHO, G.H. Cellular composition and viability of cloned bovine embryos using exogene-transfected somatic cells. **Reproduction in Domestic Animal**, 42, 44-52, 2007.

LEFEBVRE, C.; TERRET, M.E.; DJIANE, A.; RASSINIER, P.; MARO, B.; VERLHAC, M.H. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **Journal of Cell and Biology**, 157, 603-613, 2002.

LEQUARRE, A.S.; TRAVESSO, J.M.; MARCHANDISE, J.; DONNAY, I. Poly (A) RNA is reduced by half during bovine oocyte maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. **Biology of Reproduction**, 71, 425-431, 2004.

LI, G.P.; WHITE, K.L.; BUNCH, T.D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. **Cloning and Stem Cells**, 6, 5-13, 2004.

LIANG, C.G.; SU, Y.Q.; FAN, H.Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. **Molecular Endocrinology**, 21, 2037-2055, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. **Methods**, 25, 402-408, 2001

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biology of Reproduction**, 54, 1420-1429, 1996.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, 69, 17-22, 2008.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, 37, 48-53, 1994.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animal**, 38, 259-267, 2003.

MADGWICK, S.; JONES, K.T. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals cytostatic factor. **Cell Division**, 26, 2-4, 2007.

MARCHAL, R.; CAILLAUD, M.; MARTORIATI, A.; GERARD, N.; MERMILLOD, P.; GOUDET, G. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, *cumulus* expansion, hyaluronan synthases, connexin 32 and 43 expression and GH receptor mRNA expression in equine and porcine species. **Biology of Reproduction**, 69, 1013-1022, 2003.

MASS, D.H.A.; STOREY, B.T.; MASTROIANNI, L.J. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Fertility and Sterility**, 27, 1312-1317, 1976.

McEVOY, T.G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction in Domestic Animal**, 38, 268-275, 2003.

McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; SINCLAIR, K.D. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. **Reproduction**, 122, 507-518, 2001.

MEENA, C.R.; DAS, S.K. Development of water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos from *in vitro* matured oocytes reconstructed with fetal skin fibroblast cells as donor nuclei. **Animal Reproduction Science**, 93, 258-267, 2006.

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, 130, 791-799, 2005.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, 55, 89-95, 2000.

MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, H.; NAKADA, K.; HONDA, Y. Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. **Developmental Biology**, 158, 62-78, 1993.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, 73, 1367-1379, 2006.

NAGASHIMA, H.; FUJIMURA, T.; TAKAHAGI, Y.; KUROME, M.; WAKO, N.; OCHIAI, T.; ESAKI, R.; KANO, K.; SAITO, S.; OKABE, M.; MURAKAMI, H. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. **Theriogenology**, 59, 95-106, 2003.

NASHUM, B.; YUKAWA, N.; LIU, H.; AKIYAMA, T.; AOKI, F. Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. **Development**, 137, 3785-3794, 2010.

NYHOLT DE PRADA, J.K.; LEE, Y.S.; LATHAM, K.E.; CHAFFIN, C.L.; VANDEVOORT, C.A. Role for *cumulus* cell-produced EGF-like ligands during primate oocyte maturation *in vitro*. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, 296, 1049-1058, 2009.

OBACK, B.; WELLS, D. Cloning cattle. **Cloning and Stem Cells**, 5, 243-256, 2003.

OHKOSHI, K.; TAKAHASHI, S.; KOYAMA, S.I.; AKAGI, S.; ADAGI, S.; ADACHI, N.; FURUSAWA, T.; FUJIMOTO, J.I.; IZAIKE, Y.; TOKUNAGA, T. Caprine somatic cell number transfer using *in vivo* matured oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. **Animal Science**, 74, 269-276, 2003.

PARK, J.Y.; SU, Y.Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, 303, 682-84, 2004.

PEURA, T.T. Improved *in vitro* development rates of sheep somatic nuclear transfer embryos by using a reverse-order zona-free cloning method. **Cloning and Stem Cells**, 5, 13-24, 2003.

PEURA, T.T.; KLEEMANN, D.O.; RUDIGER, S.R.; NATTRASS, G.S.; MCLAUGHLAN, C.J.; WALKER, S.K. Effect of nutrition of oocyte donor on the outcomes of somatic cell nuclear transfer in the sheep. **Biology of Reproduction**, 68, 45-50, 2003.

PEURA, T.T.; LEWIS, I.M.; TROUNSON, A.O. The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, 50, 185-191, 1998.

PILCH, D.R.; SEDELNIKOVA, O.A.; REDON, C.; CELESTE, A.; NUSSENZWIG, A.; BONNER, W.M. Characteristics of gamma-H2AX *foci* at DNA double-strand breaks sites. **Biochemistry and Cell Biology**, 81, 123-129, 2003.

POLEJAEVA, I.A.; CHEN, S.H.; VAUGHT, T.D.; PAGE, R.L.; MULLINS, J.; BALL, S.; DAI, Y.; BOONE, J.; WALKER, S.; AYARES, D.L.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K.H.S. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, 404, 86-90, 2000.

PRATHER, R.S.; BARNES, F.L.; SIMS, M.M.; ROBL, J.M.; EYSTONE, W.H.; FIST, N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biology of Reproduction**, 37, 859-866, 1987.

PRATHER, R.S.; FIRST, N.L. Cloning embryos by nuclear transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, 41, 125-134, 1990.

RACEDO, S.E.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; SALAMONE, D.; NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine *in vitro* matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 75, 17-25, 2008.

RAHMAN, A.N.M.A.; ABDULLAH, R.B.; WAN-KHADIJAH, W.E. *In vitro* maturation of oocytes with special reference to goat: a review. **Biotechnology**, 7, 599-611, 2008.

RAJIKIN, M.H.; YUSOFF, M.; ABDULLAH, R.B. Ultrastructural studies of developing goat oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, 42, 1003-1016, 1994.

REDON, C.; PILCH, D.; ROGAKEU, E.; SEDELNIKOVA, O.; NEWROCK, K.; BONNER, W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. **Current Opinion in Genetics & Development**, 12, 162-169, 2002.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Review Genetic**, 2, 21-32, 2001.

REIK, W.; SANTOS, F.; DEAN, W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. **Theriogenology**, 59, 21-32, 2003.

RIBAS, R.; OBACK, B.; RITCHIE, W.; CHEBOTAREVA, T.; FERRIER, P.; CLARKE, C.; TAYLOR, J.; GALLAGHER, E.J.; MAURICIO, A.C.; SOUSA, M.; WILMUT, I. Development of a zona-free method of nuclear transfer in the mouse. **Cloning and Stem Cells**, 7, 126-138, 2005.

RIBAS, R.C.; OBACK, B.; RITCHIE, W.; CHEBOTAREVA, T.; TAYLOR, J.E.; MAURÍCIO, A.C.; SOUSA, M.; WILMUT, I. Modifications to improve the efficiency of zona-free mouse nuclear transfer. **Cloning and Stem Cells**, 8, 10-15, 2006.

RIBEIRO, E.S.; GERGER, R.P.; OHLWEILER, L.U.; ORTIGARI JR, I.; MEZZALIRA, J.C.; FORELL, F.; BERTOLINI, L.R.; RODRIGUES, J.L.; AMBRÓSIO, C.E.; MIGLINO, M.A.; MEZZALIRA, A.; BERTOLINI, M. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. **Cloning and Stem Cells**, 11, 377-386, 2009.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DELAFUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, 68, 236-243, 2003.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro versus in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, 61, 234-248, 2002.

ROGAKOU, E.P.; PILCH, D.R.; ORR, A.H.; IVANOVA, V.S.; BONNER, W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2A.X phosphorylation on serine 139. **Journal of Biology and Chemistry**, 273, 5858-5868, 1998.

RODRÍGUEZ, L.; NAVARRETE, F.I.; TOVAR, H.; COX, J.F.; CASTRO, F.O. High developmental potential *in vitro* and *in vivo* of cattle embryos cloned without micromanipulators. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 25, 13-16, 2008.

ROMAR, R.; DE SANTIS, T.; PAPILLIER, P.; PERREAU, C.; THÉLIE, A.; DELL'AQUILA, M.E.; MERMILLOD, P.; DALBIÉS-TRAN, R. Expression of maternal transcripts during bovine oocyte *in vitro* maturation is affected by donor age. **Reproduction in Domestic Animals**, (*in press*), 2010.

SALAMONE, D.F.; SANTOS, C.B.; BARANÃO, J.L.; BUSSMANN, L.; ARTUSO, J.; VALDEZ, A.; MUNAR, C.; WERNING, C.; MELO, C. Effect of different culture systems, donor cell origin and roscovitin treatment of recipient oocytes in bovine cloning. **Theriogenology**, 59, 285, 2003.

SALUSTRI, A.; CAMAIONI, A.; DI GIACOMO, M.; FULOP, C.; HASCALL, V.C. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. **Human Reproduction Update**, 5, 293-301, 1999.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L.A.; NSAL-KAC, K.U.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Review Biochemistry**, 73, 39-85, 2004.

SANSINENA, M.J.; REGGIO, B.C.; DENNISTON, R.S.; GODKE, R.A. Nuclear transfer embryos from different equine cell lines as donor karyoplasts using the bovine oocyte as recipient cytoplasm. **Theriogenology**, 58, 775-777, 2002.

SANSINENA, M.J.; TAYLOR, S.A.; TAYLOR, P.J.; DENNISTON, R.S.; GODKE, R.A. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from *in vitro* matured llama oocytes. **Cloning and Stem Cells**, 5, 191-198, 2003.

SATO, E.; IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Factors involved in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. **Journal of Animal Science**, 23, 12-18, 1977.

SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. **Developmental Biology**, 102, 493-497, 1984.

SEDELNIKOVA, O.A.; HORIKAWA, I.; REDON, C.; NAKAMURA, A.; ZIMONJIC, D.B.; POPESCU, N.C.; BONNER, W.M. Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. **Aging Cell**, 7, 89-100, 2008.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Maturation related changes in bovine oocytes under different culture conditions. **Animal Reproduction Science**, 31, 49-60, 1993.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J. S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in *cumulus* oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, 20, 1352-1365, 2006.

SHIN, D.; LU, F.; WEI, Y.; CUI, K.; YANG, S.; WEI, J.; MSEVOY, T.G. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biology of Reproduction**, 77, 285-291, 2007.

SCHOMBERG, D.W.; MAY, J.V.; MONDSCHHEIN, J.S. Interactions between hormones and growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation *in vitro*. **Journal of Steroides and Biochemistry**, 19, 291-295, 1983.

SINCLAIR, K.D.; YOUNG, L.E.; WILMUT, I.; MSEVOY, T.G. In utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. **Human Reproduction**, 5, 68-86, 2000.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, 55, 1241-1254, 2001.

SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, 65, 126-36, 2006.

SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, 40, 1257-1263, 1989.

SPEEMANN, H. Embryonic development and induction. New York: Hafner, 1938. p.210-211.

STANGL, M.; KÜHHOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic *ovum pick-up* in sheep. **Theriogenology**, 52, 709-716, 2009.

SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; NORTHEY, D.L.; SCHUETZKUS, V.; FIRST, N.L. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Developmental Biology**, 16, 729-739, 1994.

SUTTEVUN, T.; PARNPAL, R.; SMITH, S.L.; CHANG, C.; MUENTHAISON, S.; TIAN, X.C. Epigenetic characteristics of cloned and *in vitro*-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Journal of Animal Science**, 84, 2065-2071, 2006.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of *in vivo* and *in vitro* environments in the metabolism of the *cumulus*-oocyte complex and its influence on the oocyte developmental competence. **Human Reproduction Update**, 9, 35-48, 2003.

TAKANASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, Z.H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, 54, 137-145, 1999.

TECIRLIOGLU, R.T.; COONEY, M.A.; LEWIS, I.M.; KORFIATIS, N.A.; HODGSON, R.; RUDDOCK, N.T.; VAJTA, G.; DOWNIE, S.; TROUNSON, A.O.; HOLLAND, M.K.; FRENCH, A.J. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. **Reproduction Fertility and Development**, 17, 573-85, 2005.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, 26, 90-100, 1990.

TERVIT, H.R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Animal Reproduction Science**, 42, 227-238, 1996.

THIBAULT, C. Recent data on the development of cloned embryos derived from reconstructed eggs with adult cells. **Reproduction Nutritional and Development**, 43, 303-324, 2003.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos-a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, 60/61, 263-275, 2000.

TIBARY, A.; ANOUASSI, A.; KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. **Theriogenology**, 64, 618-638, 2005.

VAJTA, G. Handmade cloning: the future way of nuclear transfer? **Trends in Biotechnology**, 25, 250-253, 2007.

VAJTA, G.; BARTELS, P.; JOUBERT, J.; DE LA REY, M.; TREADWELL, R.; CALLESEN, H. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the Handmade Cloning (HMC) and the submarine incubation system (SIS). **Theriogenology**, 62, 1465-1472, 2004.

VAJTA, G.; KRUGH, P.M.; MTANGO, N.R.; CALLESEN, H. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. **Reproduction Fertility and Development**, 17, 91-112, 2005.

VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; HYTTTEL, P.; THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, 3, 89-91, 2001.

VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; TROUNSON, A.O.; PURUO, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; SSCHMINDT, M.; PEDERSEN, H.G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. **Biology of Reproduction**, 68, 571-578, 2003.

VAJTA, G.; PEURA, T.T.; HOLM, P.; PÁLDI, A.; GREVE, T.; TROUNSON, A.O.; CALLESEN, H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, 55, 256-264, 2000.

VAJTA, G.; PEURA, T.T.; LAI, L.; MURPHY, C.N.; PRATHER, R.S.; KRAGH, P.M.; HOLM, P.; CALLESEN, H. Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for Handmade Cloning (HMC) in cattle and pig. **Reproduction, Fertility and Development**, 16, 159, 2004.

VEECK, L.L. Oocyte assessment and biological performance. **The New York Academy Sciences**, 541, 259-274, 1988.

VELLILLA, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; VIDAL, F.; PARAMIO, M.T.; Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Zygote**, 10, 201-208, 2002.

UHM, S.J.; CHUNG, H.M.; KIM, S.W.; KIM, N.H.; LEE, H.T.; CHUNG, K.S. Expression of epidermal growth factor receptor in porcine oocytes and preimplantation embryos. **Theriogenology**, 51, 258, 1999.

UHM, S.J.; GUPTA, M.K.; YANG, J.H.; CHUNG, H.J.; MIN, T.S.; LEE, H.T. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, 73, 1024-1036, 2010.

VAN ZUTPHEN, L.F.M.; BALLS, M. Animal alternatives, welfare and ethics. (Elsevier: Amsterdam), 1997.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A.C.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K.R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with *cumulus* cell nuclei. **Nature**, 394, 369-374, 1998.

WANG, L.; PENG, T.; ZHUB, H.; LV, Z.; LIU, T.; SHUAI, Z.; GAO, H.; CAI, T.; CAO, X.; WANG, H. *In vitro* development of reconstructed ibex (*Capra ibex*) embryos by nuclear transfer using goat (*Capra hircus*) oocytes. **Theriogenology**, 73, 135-141, 2007.

WANG, H.; WANG, M.; BOCKER, W.; ILIAKIS, G. Complex H2A.X phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells sed to ionizing and treated with kinase inhibitors. **Journal of Cell and Physiology**, 202, 492-502, 2005.

WANI, N.A.; WERNEY, U.; HASSAN, F.A.H.; WERNERY, R.; SKIDMORE, J.A. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, 82, 373-379, 2010.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; CAMPBELL, B. K.; HUNTER, M. G. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, 68S, S22-S29, 2007.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local intersctions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, 82, 63-74, 2004.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; DAY, T.A.; TERVIT, H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, 60, 996-1005, 1999.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; DAY, T.A.; TERVIT, H.R. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between *in vivo*- and *in vitro*-matured cytoplasts. **Biology of Reproduction**, 57, 385-393, 1997.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R.; VIVANCO, W.H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reproduction Fertility and Development**, 10, 369-378, 1998.

WESTERGAARD, L.G.; ANDERSEN, C.Y. Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles. **Human Reproduction**, 4, 257-260, 1989.

WILLADSEN, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, 320, 63-65, 1986.

WILLADSEN, S.M.; JANZEN, R.E.; MCALISTER, R.J.; SHEA, B.F.; HAMILTON, G.; MCDERMAND, D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. **Theriogenology**, 35, 161-170, 1991.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H.S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, 385, 810-813, 1997.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. **Journal of Reproduction and Fertility**, 112, 387-398, 1998.

WRENZYCKI, C.; WELLS, D.; HERRMANN, D.; MILLER, A.; OLIVER, J.; TERVIT, R.; NIEMANN, H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, 65, 309-317, 2001.

XU, K.P.; GREVE, T.; SMITH, S.; HYTTEL, P. Chronological changes of bovine follicular oocytes maturation *in vitro*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 27, 505-519, 1986.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Review in Reproduction**, 3, 155-263, 1998.

ZHANG, L.S.; JIANG, M.X.; LEI, Z.L.; LI, R.C.; SANG, D.; SUN, Q.Y.; CHEN, D.Y. Development of goat embryos reconstituted with somatic cells: the effect of cell-cycle coordination between transferred nucleus and recipient oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, 50, 661-666, 2004.

ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophs induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Molecular Human Reproduction**, 15, 339-409, 2009.

ZHOU, B.B.; ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, 408, 433-439, 2000.

ZHOU, H.; LIU, C.; WANG, W. Heterospecific nuclear-transferred embryos derived from equine fibroblast cells and enucleated bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animal**, 42, 243-247, 2007.

ZIEGLE-BIRLING, C.; HELMRICH, A.; TORA, L.; TORRES-PADILLA, M.E.T. Distribution of p53 binding protein 1 (53BP1) and phosphorylated H2A.X during mouse preimplantation development in the absence of DNA damage. **The International Journal of Developmental Biology**, 53, 1003-1011, 2009.

ZOU, X.; CHEN, Y.; WANG, Y.; LUO, J.; ZHAN, Q.; ZHANG, X.; YANG, Y.; JU, H.; SHEN, Y.; LAO, W.; XU, S.; DU, M. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with *cumulus* cells. **Cloning**, 3, 31-37, 2001.

ZUELKE, K.A.; BRACKETT, B.G. Luteinizing hormone enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biology of Reproduction**, 43, 784-787, 1990.

12. APÊNDICES

12.1. APÊNDICE A

RESUMO PUBLICADO: *Acta Scientiae Veterinariae*, **38 (Supl. 2)**: 675, 2010.

AVALIAÇÃO DE DANOS DE DNA POR DETECÇÃO DA γ H2AX EM EMBRIÕES BOVINOS PRECOSES PRODUZIDOS POR FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV), PARTENOGENÊSE E TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS)[†]

Pereira, A.F.^{1*}; Melo, L.M.¹; Freitas, V.J.F.¹; Salamone, D.²

¹Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Brasil.

²Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade de Buenos Aires (UBA), Argentina.

*Bolsista CAPES/PDEE E-mail: salamone@agro.uba.ar

Embriões produzidos por manipulação *in vitro* apresentam danos no DNA ocasionados pela exposição às condições artificiais. A formação de *foci* de H2A.X fosforilada (γ H2A.X) é utilizada como marcador desses danos. O objetivo do estudo foi detectar quantitativamente a γ H2A.X em embriões precoces bovinos produzidos por manipulação *in vitro*. Complexos *cumulus*-oócito recuperados de ovários de abatedouros foram maturados em TCM199 modificado por 22-24 h a 39 °C e 5% de CO₂. Os embriões foram obtidos por FIV, partenogênese ou TNCS. Para a FIV, oócitos maturados foram incubados com 15×10^6 espermatozóides/mL. Partenos foram produzidos pela ativação de oócitos maturados utilizando 5 μ M de ionomicina (4 min) e 2 mM de 6-DMAP (3 h). Os embriões TNCS livres de zona foram obtidos pelo método descrito por Oback *et al.* (2003, *Cloning Stem Cells* 5, 3-12). Embriões reconstruídos foram ativados conforme descrito para os partenos. Todos os tipos de embriões foram incubados em SOF a 39 °C e 5% de CO₂. Embriões livres de zona foram cultivados em sistema WOW. A detecção da γ H2A.X foi realizada por imunofluorescência indireta em embriões pró-nucleares (PN) e 2 células (2C). As amostras foram avaliadas em microscópio confocal e as imagens analisadas pelos softwares EZ-C12.20 e ImageQuantTL. Para cada tipo de embrião e estágio de desenvolvimento foram obtidos, no mínimo, 10 estruturas. Número de *foci* de γ H2A.X e área de cromatina danificada por núcleo foram analisados utilizando ANOVA seguida de teste Tukey ($P < 0,05$). Para os embriões PN, as médias do número de *foci* de γ H2A.X/núcleo ($309,5 \pm 70,2$; $164,6 \pm 38,2$; $147,4 \pm 35,1$) e área de cromatina danificada/núcleo ($7007,1 \pm 3547,7$; $2837,2 \pm 728,0$; $3074,3 \pm 659,6$ pixels) não diferiram entre embriões oriundos de FIV, partenogênese e TNCS, respectivamente. Já os embriões 2C oriundos de TNCS apresentaram uma área de cromatina danificada/núcleo duas vezes maior que em partenos ($P < 0,05$). Além disso, embriões clones apresentaram um aumento no número de *foci* de γ H2A.X/núcleo durante o desenvolvimento de PN para 2C ($147,4 \pm 35,1$ vs. $553,3 \pm 216,0$; $P < 0,05$). Este mesmo padrão foi observado para a área de cromatina danificada ($3074,3 \pm 659,6$ vs. $12780,8 \pm 742,6$ pixels). Isso sugere que embora os danos no DNA ocorram, os mecanismos de reparo nessa transição não são capazes de promover a recuperação desses embriões. Investigações futuras são necessárias para elucidar as deficiências desses mecanismos. Esses conhecimentos ajudarão a compreender os processos envolvidos nas etapas iniciais do desenvolvimento de embriões produzidos por FIV, partenogênese e TNCS, além de serem igualmente importantes em outras tecnologias, como, por exemplo, a transgênese.

[†] **Primeiro lugar da Competição de Estudantes durante a XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embrião (SBTE), Porto de Galinha-PE-Brasil.**

12.2. APÊNDICE B

RESUMO PUBLICADO: *Animal Reproduction*, 7 (3): 303, 2010.

CLONING IN GOATS: COMPARISON OF TWO TECHNIQUES FOR OOCYTE RECOVERY

A.F. Pereira¹; A.S. Alcântara Neto¹; I.S. Carneiro²; F.C. Sousa¹; C.H.S. Melo¹; T.M. Almeida¹; D.I.A. Teixeira¹; L.M. Melo¹; M. Bertolini²; V.J.F. Freitas¹

¹ Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Ceará State University

² Laboratory of Molecular Biology and Development, UNIFOR, Fortaleza-CE, Brazil

Introduction

Animal cloning represents a valuable tool for the production of bioreactor animals (1). However, cloning efficiency in many animal species, such as goats, is directly dependent on the source and availability of good quality oocytes. The aim of this study was to compare the recovery efficiency of goat oocytes using laparoscopic or aspiration of slaughterhouse ovaries.

Material and Methods

For laparoscopic oocyte recovery (LOR), the estrous cycle of 36 goats was synchronized using sponges impregnated with 60 mg medroxyprogesterone acetate (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) inserted intravaginally for 11 days. On day 8, a 50 µg d-cloprostenol (Ciosin, Ford Dodge Saúde Animal, Campinas, Brazil) injection was given intramuscularly (IM), along with the onset of the ovarian stimulation, which was carried out using 120 mg pFSH (Folltropin-V, Vetrepfarm, Ontario, Canada) distributed in five IM injections (30/30, 20/20 and 20 mg), 12 h apart. Animals were fasted for 24 h prior to the LOR, which was performed at the time of sponge removal. Conversely, ovaries from 63 well fed goats were collected at a local slaughterhouse and transported to the laboratory in saline at 30°C. All ≥ 2 -mm follicles were counted, followed by follicular aspiration for both groups using a system for small ruminants (WTA, Cravinhos, Brazil). Retrieved *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were classified based on morphological criteria (2). Data regarding the mean number of follicles, total COCs, and viable COCs, on a *per* female basis, and the recovery efficiency (COCs *per* number of follicles) were analyzed using the Student's t-test or the χ^2 test, for $p < 0.05$.

Results and Discussion

After three sections of LOR and five replications with slaughterhouse ovaries, the mean number per goat of aspirated follicles (588/36 vs. 1.029/63; 16.3. vs. 16.3), total COCs (429/36 vs. 885/63; 11.9 vs. 14.0) and the number of viable COCs (385/36 and 720/63; 10.7 vs. 11.4) did not differ between the oocyte retrieval groups. However, the COC recovery efficiency for slaughterhouse ovaries was higher than for the laparoscopic procedure (86.0% vs. 73.0%, respectively). The higher recovery efficiency from slaughterhouse ovaries was likely due to a stricter control over the follicular aspiration process than the remote laparoscopic approach. Visually undetected follicles may also be aspirated when controlled by hand, improving the recovery efficiency. In conclusion, despite the lower COC recovery efficiency, our preliminary results indicate that the *in vivo* laparoscopic procedure was as efficient as the use of slaughterhouse ovaries for the obtention of goat COCs, with both retrieving methods rendering a similar number of good quality oocytes, on a *per* goat basis.

References

(1) Keefer CL. 2004. *Animal Reproduction Science*, 82-83: 5-12; (2) Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Gauthier M, Neveu N, Lapointe J, Sneek L, Leduc M, Duguay F, Zhou JF, Lazaris A, Karatzas CN. 2003. *Theriogenology*. 59: 831-839.

Financial support: FUNCAP, CNPq and FINEP/MCT (Recodisa)

12.3. APÊNDICE C

RESUMO PUBLICADO: *Acta Scientiae Veterinariae*, **38 (Supl. 2):** 797, 2010.

HANDMADE CLONING IN GOATS

Alcântara Neto, A.S.¹; Carneiro, I.S.²; **Pereira, A.F.¹**; Almeida, K.C.¹; Feltrin, C.²; Lima-Verde, J.B.²; Bertolini, L.R.²; Melo, L.M.¹; Freitas, V.J.F.¹; Bertolini, M.²

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE); ²Universidade de Fortaleza (UNIFOR)
Fortaleza, CE, Brasil

A tecnologia da clonagem animal tem sido o foco de interesse de muitos grupos de pesquisa em todo mundo. Apesar dos esforços, a clonagem continua ineficiente, especialmente quando aplicada a outras espécies, que não a bovina. Recentemente, métodos alternativos de clonagem, como o *handmade cloning* (HMC), têm simplificado o processo, diminuindo também o tempo e o custo para a formação de pessoal e para a produção de embriões. O objetivo deste estudo foi adaptar o procedimento de *handmade cloning* para caprinos, baseado em nossos procedimentos em bovinos (Ribeiro *et al.* 2009, Cloning Stem Cells, 11:377-386), visando a produção de embriões clones transgênicos. Complexos *cumulus*-oócito caprinos (CCOs) oriundos de ovários de abatedouro foram maturados *in vitro* em meio composto de meio de manipulação (MM: TCM199, 0,022 µg/mL de piruvato de sódio, 10.000 UI de penicilina, 10.000 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 25 µg/mL de anfotericina B) suplementado com 10 µg/mL de EGF, 5 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de LH, 1 µg/mL de E₂, 100 µM de cisteamina e 10% de soro de cabra em estro (SCE), por 20 h a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade saturada. Após a remoção de células do *cumulus* e seleção do corpúsculo polar (CP), oócitos maturados foram expostos a 0,25% de protease para a remoção da zona pelúcida, seguido da lavagem em soro fetal bovino puro (SFB) e várias lavagens em MM + 10% de SFB. Oócitos sem zona foram bisseccionados manualmente em 2,5 µg/mL de citocalasina B, com os hemi-citoplastos enucleados sendo selecionados sob luz ultravioleta. Em seguida, dois hemi-citoplastos expostos à fitohemoaglutina foram aderidos a um único fibroblasto proveniente de cultivo celular primário entre a 2ª e 4ª passagem, em elevada confluência (>95%), obtido a partir de uma biópsia cutânea de uma cabra transgênica para o hG-CSF. As estruturas reconstruídas foram eletrofusionadas por dois pulsos de corrente contínua de 1,1 kV/cm por 5 µs (~26 h pós-MIV), após uma breve exposição a um pulso de pré-fusão de corrente alternada de 7,0 V. As estruturas fusionadas foram ativadas em ionomicina/6-DMAP para serem individualmente cultivadas *in vitro* no sistema WOW em meio SOFaa + 2% de SFB + 0,3% de BSA, a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, por sete dias. Em três repetições, a taxa de maturação, com base na seleção dos CP, foi de 84,6% (549/649), com uma taxa de fusão atingindo 83,2% (139/167). A taxa de clivagem foi de 85,4% (105/123), com 17,1% dos embriões atingindo estádios transferíveis (8 mórulas compactas e 13 blastocistos/105) no Dia 7 de desenvolvimento. Esses resultados preliminares são semelhantes aos relatados por outros autores utilizando o procedimento clássico de clonagem. Em conclusão, a clonagem manual (HMC) parece ser uma alternativa eficaz para a produção de embriões clones transgênicos caprinos. Estudos adicionais encontram-se em andamento visando o nascimento de clones viáveis.

Projeto de pesquisa da RECODISA financiado pela FINEP/MCT.

12.4. APÊNDICE D

RESUMO PUBLICADO: *Acta Scientiae Veterinariae*, **38 (Supl. 2)**: 753, 2010.

EFEITO DE DIFERENTES TRATAMENTOS HORMONAIS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA SOBRE A PRODUÇÃO OOCITÁRIA E MATURAÇÃO *IN VITRO* EM CABRAS DA RAÇA CANINDÉ

Freitas, V.J.F.; **Pereira, A.F.**; Alcântara Neto, A.S.; Sousa, F.C.; Moura, R.R.; Albuquerque, E.S.; Luciano, C.M.S.; Souza, J.M.G.; Teles Filho, A.C.; Teixeira, D.I.A.; Melo, L.M.

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza-CE, Brasil.

E-mail: vjff@pq.cnpq.br

A raça Canindé foi naturalizada no Nordeste brasileiro e caracteriza-se por alta rusticidade. Devido ao risco de ser extinta, o uso de biotecnologias reprodutivas pode aumentar consideravelmente o número de indivíduos dessa raça. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito de diferentes tratamentos hormonais de estimulação ovariana sobre a quantidade e qualidade dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) recuperados por laparoscopia e sua posterior taxa de maturação *in vitro* (MIV). Dezoito cabras Canindé receberam esponja intravaginal impregnada com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por 11 dias e 50 µg de d-cloprostenol (Ciosin, Schering Plough, São Paulo, Brasil) por via i.m. no oitavo dia do tratamento. As cabras foram divididas em três grupos e receberam: i) cinco doses (CD) de pFSH (120 mg, Folltropin-V, Vetrepfarm, Ontario, Canadá) por via i.m. em intervalos de 12 h a partir do oitavo dia do tratamento progestágeno; ii) três doses (TD) de pFSH (120 mg) também a partir do oitavo dia, em intervalos de 24 h e iii) única dose (UD) de pFSH (70 mg) associada a eCG (200 UI; Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) por via i.m., administrada 36 h antes da remoção da esponja. Foram realizadas três sessões de tratamento hormonal e colheita de oócitos e para cada sessão, seis cabras foram alocadas em um tratamento distinto. Os oócitos foram colhidos por laparoscopia no mesmo momento da retirada das esponjas e submetidos à MIV em 5% de CO₂ e 38,5°C por 24 h. Os dados foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Tukey ou através do teste do qui-quadrado, conforme o caso. Os testes foram realizados no programa STATSOFT 7.0 e os resultados estão apresentados como média ± epm. Para folículos puncionados e CCOs recuperados verificou-se uma média de 15,1 ± 0,7 e 11,3 ± 0,8, respectivamente; resultando em uma taxa de recuperação total de 74,5%. Não foram observadas diferenças (P>0,05) entre os tratamentos para o número médio de folículos visualizados e puncionados. A média do número de CCOs obtidos por cabra foi similar (P>0,05) para CD (12,4 ± 1,0), TD (10,7 ± 1,0) e UD (10,8 ± 1,0). No entanto, menores taxas de recuperação e de maturação (P<0,05) foram verificadas no tratamento TD (67,9%; 32,1%) quando comparado ao CD (84,1%; 49,1%) ou UD (72,4%; 46,2%). Portanto, o tratamento TD foi menos eficiente na produção de oócitos e posterior MIV, quando comparado aos demais. Embora o tratamento UD tenha produzido uma resposta similar ao CD, o primeiro tem a vantagem de ser mais prático, sendo o recomendado para estimulação ovariana, podendo inclusive ser utilizado em programas de conservação da raça Canindé.

Projeto financiado pelo CNPq e FUNCAP.

12.5. APÊNDICE E

RESUMO PUBLICADO: *Reproduction, Fertility and Development*, **22(1)**: 320-320, 2010.

IN VITRO MATURATION OF OOCYTES FROM CANINDE GOATS SUBMITTED TO DIFFERENT HORMONAL TREATMENTS FOR OVARIAN STIMULATION

K.C. Almeida; **A.F. Pereira**; A.S. Alcântara Neto; S.R.G. Avelar; F.C. Sousa; L.M. Melo; D.I.A. Teixeira; V.J.F. Freitas

Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Faculty of Veterinary, University of State of Ceará (UECE), Fortaleza-CE, Brazil.

Oocyte *in vitro* maturation (IVM) is a long process during which oocytes acquire their ability to support the stages of development in a stepwise manner, ultimately reaching activation of the embryonic genome. The overall success of this process can be affected by factors such as hormonal treatment for ovarian stimulation. Thus, current study aims to evaluate the possible effects of the ovarian stimulatory protocols on the goat oocyte quality and IVM rate. Adult and cyclic Canindé goats were heat synchronized by means of intravaginal sponges impregnated with 60 mg medroxyprogesterone acetate (MAP, Progespon, Syntex, Argentina) inserted for 11 days coupled with a luteolytic injection of 50 µg cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brazil) in the 8th day of treatment. The ovarian stimulation was carried out using one of the following protocols: a) standard multi-doses (MD) with 120 mg pFSH (Folltropin-V, Vetrepfarm, Canada) distributed in five injections (30/30; 20/20; 20 mg) at 12 h intervals (n=18); b) three-doses (TD) with 120 mg pFSH administered in three injections (60; 40; 20 mg) at 24 h intervals (n=17); c) oneshot (OD) of 70 mg pFSH plus 200 iu of eCG (Novormon, Syntex, Argentina) administered 36 h before sponge removal (n=17). In MD and TD groups, the pFSH injections started in 8th day of progestagen treatment. The follicles were aspirated just after the sponge removal using the laparoscopic oocyte recovery (LOR). This procedure was performed with a 22-gauge needle and a vacuum pump to 30 mmHg. The collection medium was TCM199 supplemented with HEPES (10 mM), heparin (20 iu/mL) and gentamicin sulfate (40 µg/mL). *Cumulus*-oocyte complexes (COCs) were classified as grade I, II, III or IV based on visual criteria (Baldassarre H et al., 2003 *Theriogenology* 56, 831-839). Good quality oocytes (grade I and II) were incubated in TCM199 supplemented with cysteamine (100 µM), EGF (10 ng/mL) and gentamicin sulfate (40 µg/mL) at 38.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air for 24 h. Oocyte maturation was assessed by the visualization of first polar body under inverted microscope. Data were expressed in percentage and analyzed using the Fischer's exact test. No statistical differences among hormonal treatments ($P > 0.05$) were observed for the percentage of the good quality oocytes, with $70.4 \pm 3.0\%$ of COCs graded in I and II. The IVM rate in TD (31.4%) was statistically lower than MD (31.4% vs 46.5%, $P = 0.04$) group. However, no significant differences ($P = 0.89$) were observed between OD (45.2%) and MD groups. Thus, current results indicate that oocyte production for IVM can be facilitated using ovarian stimulation with oneshot FSH/eCG regime, without affect meiotic competence. In summary, OD and MD treatments can be used for oocyte IVM in an embryo production programme in Canindé goats.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the following Brazilian agencies: FINEP, CNPq, FUNCAP and CAPES.

12.6. APÊNDICE F

RESUMO PUBLICADO: *Reproduction, Fertility and Development*, **22 (1)**: 321-322, 2010.

EFFECT OF SUCESSIVE LAPAROSCOPIC OOCYTE RECOVERY AFTER HORMONAL TREATMENT IN CROSSBRED GOATS RAISED IN NORTHEASTERN OF BRAZIL

S.R.G. Avelar; K.C. Almeida; **A.F. Pereira**; F.C. Sousa; R.R. Moura; A.C.A. Teles Filho; C.H.S. Melo; E.S. Albuquerque; F.B. Pereira; L.M. Melo; D.I.A. Teixeira; V.J.F. Freitas

Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Faculty of Veterinary, University of State of Ceará (UECE), Fortaleza-CE, Brazil.

Laparoscopic oocyte recovery (LOR) is a valuable tool for obtaining oocytes for *in vitro* embryo production. When preceded by treatment of ovarian stimulation, this technique produces an increase in the amount of oocytes recovered. However, a little information has been found to respect the effect of successive hormonal treatments on both oocyte quantity and quality. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the ovarian response and quanti-qualitative *cumulus*-oocyte complexes (COCs) production. Five adult crossbred goats were hormonally treated with intravaginal sponges containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP, Progespon, Syntex, Argentina) for 11 days. In the 8th day of progestagen treatment, was administered 50 µg of prostaglandin F_{2α} analogue (Ciosin, Coopers, Brazil), by i.m. injection. At this time, ovarian stimulation was initiated by the administration of 120 mg pFSH (Folltropin-V, VetrepHarm, Canada) distributed in five decreasing doses (30/30, 20/20, 20 mg), at 12 hours intervals. The animals were fasted for 24 h before laparoscopic procedure, which was performed just after the sponge removal. It was used a laparoscopic system connected to a 22 gauge needle (WTA, Watanabe, Brazil) and a vacuum pump (Biovacuum, Biocom, Brazil) providing 30 mmHg. All follicles with a size higher than 2 mm present in both ovaries were counted and aspirated. The collection medium was TCM199 supplemented with HEPES (10 mM), heparin (20 IU/mL) and gentamicin (40 µg/mL). The COCs were graded based on presence of *cumulus* cells and cytoplasm homogeneity (I to IV). The hormonal treatment and LOR procedures were repeated three times at 14 days intervals. Data were expressed in percentage or mean ± SEM. The differences were analyzed using ANOVA and Tukey's or Fischer's exact test when appropriate, with $p < 0.05$. No statistical differences were found ($p > 0.05$) for the follicle number obtained in each LOR session: 17.0 ± 3.91 , 18.75 ± 2.59 and 18.0 ± 4.73 , respectively. Repeated LOR procedures also did not affected ($p > 0.05$) the aspirated follicle number (15.0 ± 3.92 , 15.5 ± 2.33 and 16.0 ± 4.36), resulting of the three sessions, respectively. Average recovery rate were not statistically different ($p > 0.05$), resulting in 74.7%, 62.9% and 64.6% between sessions. With respect to the percentage of viable COCs (GI and GII) were not observed statistical differences ($p > 0.05$), as verified the follow values at 1st to 3rd sessions: 76.79%, 84.62% and 74.19%. In conclusion, three successive hormonal stimulation LOR procedures no cause detrimental effects on the quanti-qualitative oocyte production, suggesting that this protocol can be used for programs of *in vitro* goat embryos production developed in northeastern of Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported the following Brazilian agencies: FINEP, CNPq, FUNCAP and CAPES.

12.7. APÊNDICE G

RESUMO PUBLICADO: *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Belo Horizonte–MG–Brasil, 2009.

COLHEITA OOCITÁRIA POR LAPAROSCOPIA (COL) EM CABRAS NÃO ESTIMULADAS HORMONALMENTE

S.R.G. Avelar; K.C. Almeida; **A.F. Pereira**; F.C. Sousa; R.R. Moura; A.S. Alcântara Neto; A.C.A. Teles Filho; L.M. Melo; D.I.A. Teixeira; V.J.F. Freitas

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução - Universidade Estadual do Ceará
Av. Dedé Brasil, 1700, 60740-903. Fortaleza-Ceará.

Introdução

A produção *in vitro* de embriões em caprinos pode ser uma valiosa ferramenta para o rápido melhoramento genético do rebanho. A colheita oocitária por laparoscopia (COL) apresenta-se como uma fonte de oócitos em quantidade e qualidade; no entanto, este processo é normalmente realizado após estimulação hormonal nas fêmeas doadoras (Gibbons *et al.* 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros quanti-qualitativos de oócitos recuperados por COL, em fêmeas caprinas não estimuladas hormonalmente, e submetidos à maturação *in vitro* (MIV).

Material e Métodos

Foram utilizadas oito cabras adultas cíclicas as quais foram submetidas a jejum hídrico-alimentar e anestesia. O sistema de colheita consistiu de uma agulha 22G e uma bomba de vácuo a 30 mmHg. Os folículos (≥ 2 mm) foram contados e aspirados. Os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram recuperados em TCM199 acrescido de HEPES, heparina e gentamicina. Os CCOs foram classificados em graus (I a IV) quanto à presença de células do *cumulus* e homogeneidade do citoplasma. Para a MIV, CCOs de grau I e II foram incubados em TCM199 suplementado com cisteamina, EGF e gentamicina a 5% de CO₂, 38,5 °C por 24 h. A verificação da maturação foi realizada pela marcação dos oócitos com Hoechst 33342 em microscópio de epifluorescência. Os dados foram expressos como média $\pm$ e.p.m.

Resultados e Discussão

Foram verificados $4,7 \pm 2,6$ e $1,9 \pm 0,4$ folículos visualizados e oócitos recuperados por cabra, respectivamente, resultando numa taxa de recuperação de 39,5%. Dos oócitos colhidos, 6,6, 53,3 e 40,1% foram classificados como grau I, II e III, respectivamente. Estes resultados mostram-se similares aos citados na literatura (Aguillar *et al.* 2002). Após MIV, observou-se 77,7% de taxa de maturação. Assim, a COL a partir de cabras não estimuladas pode se apresentar como uma opção para a obtenção de oócitos competentes à MIV.

Referências bibliográficas

- AGUILLAR, B.; ROCHE, A.; OLIVERA, J.; FOLCH, J.; ALABART, J. L. Oocyte retrieval after repeated *ovum pick-up* in unstimulated sheep and goat. In: **Proceedings of the 18th Meeting Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)**, 2002.
- GIBBONS, A.; PEREYRA-BONNET, F.; CUETO, M.I.; CATALA, M.; SALAMONE, D.F.; GONZALEZ-BULNES, A. Procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 59, p.423-426, 2007.

12.8. APÊNDICE H

RESUMO PUBLICADO: *Transgenic Research*, **19**: 146, 2010.

GENERATION OF TRANSGENIC NATURALIZED GOATS PRODUCING HUMAN GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR (HG-CSF) IN BRAZIL

V.J.F. Freitas^{1*}; D.I.A. Teixeira¹; L.M. Melo¹; E.S.Lopes Jr²; R.R. Moura¹; **A.F. Pereira¹**; F.C. Sousa¹; K.C. Almeida¹; S.R.G. Avelar¹; J.B. Cajazeiras¹; L.P.B. Dias³; G.A. Dvoryanchikov⁴; L.E. Andreeva⁵; I.A. Serova⁵; O.L. Serov⁵

¹ Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Brazil

² Federal University of Vale do São Francisco, Brazil

³ Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fiocruz, Brazil

⁴ School of Medicine, University of Miami, USA

⁵ Russian Academy of Science, Russia

In Brazil, the majority of naturalized goats are endangered (Canindé, Moxotó, Marota and Repartida). These goats are well adapted to semi-arid conditions and need to be preserved to favor biodiversity. One of the ways to develop interest in this breed would be to utilize it in transgenesis program. Thus, the aim of this study was generate naturalized goats producing hG-CSF in milk. For this, Canindé goats were used as donors and undefined breed goats as recipients. All females were submitted to standard estrus synchronization treatment. Donors were superovulated with 120 mg pFSH and also received 100 µg GnRH at 36 h after the end of estrus synchronization treatment. Donors were hand mated by Canindé males and embryo recovery was performed by oviductal flushing at 72 h after the end of hormonal treatment. The pronuclear embryos were centrifuged before the microinjection with a DNA construction (6435 bp) containing the hG-CSF fused to the 5'-flanking sequence of goat α s1-casein and 3'-flanking sequence of bovine α s1-casein. Two transgenic kids (1 male and 1 female) were identifying by PCR amplifications of two distinct DNA regions. The hormonally induced lactation was performed in transgenic female at 10 month-of-age and milk samples were recovered at lactation peak. The hG-CSF concentration was determined by the ELISA method and achieved 70 µg per milliliter of milk. Our system showed to be efficient in order to generate transgenic goats producing high levels of hG-CSF. The use of Canindé goats in transgenesis programs can increase the interest in their breeding and contribute to save them from extinction.

12.9. APÊNDICE I

RESUMO PUBLICADO: *Transgenic Research*, **19**: 147, 2010.

PERSISTENT NEUTROPHILIA IN CLINICALLY HEALTHFUL hG-CSF-TRANSGENIC GOATS IN BRAZIL

L.M. Melo^{1*}; V.H.V. Rodrigues¹; R.R. Moura¹; A.S. Alcântara Neto¹; **A.F. Pereira¹**; E.S. Albuquerque¹; C.H.S. Melo¹; L.E. Andreeva²; I.A. Serova²; D.C.S.N. Pinheiro¹; V.J.F. Freitas¹

¹ Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Brazil

² Russian Academy of Science, Russia

Human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) has been the most widely used as a hematopoietic growth factor due to its efficacy against different forms of neutropenia, chemotherapy-induced leucopenia, and in the mobilization of progenitor cells for transplantation. Our group obtained a male (TM) and a female (TF) Canindé goat harboring goat α s1-casein promoter/hG-CSF. Transgenic and non-transgenic goats were submitted to hematological and blood chemical examinations up to 9.4 month-of-age. On 1.5 month and biweekly thereafter blood samples were collected for both hematological evaluation and serum biochemistry analysis. Total (WBC) and differential white blood cell counts were determined by Cell-Dyn 3700 analyzer. Urea, creatinine, glucose and enzymes (AST, ALT and LDH) were measured by BT 3000 plus analyzer. The data were presented as mean $\pm$ SEM and were qualitatively compared with normal reference values for goats. Non-transgenic goats presented a WBC count (8.45 ± 0.56 k/ μ L) within the normal range for the species, while for transgenic goats the value was almost 3-fold increased (24.57 ± 1.88 k/ μ L). This leukocytosis was produced by the elevated number of neutrophils (18.35 ± 1.85 k/ μ L), without changes in others cell granulocytic and non-granulocytic counts. Strikingly, increased neutrophil counts were seen in transgenic goats before they reached 5.2-month-old and the highest values occurred at 1.5 month-of-age (53.0 k/ μ L and 43.2 k/ μ L for TM and TF, respectively). Although the average values have decreased to 14.94 ± 1.56 k/ μ L (TM) and 11.18 ± 1.04 k/ μ L (TF) the neutrophilia persisted until 9.4 month-of-age. The serum biochemistry profiles of transgenic and non-transgenic goats were within the normal range for the species. These findings indicated normal liver and renal functions and the absence of general health disorders. In conclusion, young transgenic goats presented neutrophilia, especially before five month-of-age, and remained clinically healthful. Factors other than extensive neutrophilia could be required for the development of health disorders in hG-CSF transgenic goats.