

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES PARTENOGENÉTICOS DE CUTIAS USANDO CLORETO DE ESTRÔNCIO E CITOCALASINA B

*(Production of parthenogenetic embryos from agoutis
using strontium chloride and cytochalasin B)*

Érika Almeida PRAXEDES¹, Lhara Ricarliany Medeiros de OLIVEIRA^{1*}, Maria Valéria de Oliveira SANTOS¹, Leonardo Vitorino Costa de AQUINO¹, Moacir Franco de OLIVEIRA², Alexsandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró/RN;

²Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (UFERSA). *E-mail: lharagirs@hotmail.com

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effect of strontium chloride (SrCl₂) with cytochalasin B (CB) on the activation of agouti oocytes matured *in vitro* for embryo production. Thus, ovaries were used for oocyte recovery by slicing. Subsequently, viable oocytes were destined for *in vitro* maturation (IVM) and after 24 h evaluated for the expansion and viability of the *cumulus* cells and presence of the first polar body (1PB). After IVM, oocytes were activated with a combination of 10 mM SrCl₂ and 5 µg/mL CB for 6 h and evaluated for embryo development kinetics. Hence, 93.3% of *cumulus* cell expansion was observed, with 91.2% viability and 37.3% of oocytes with the presence of 1PB. Regarding embryonic development, 43.2% (19/44) of cleaved structures and 6.8% (3/44) of morulae were observed in relation to the number of oocytes and 18.8% (3/16) morulae in relation to the number of cleaved structures. Thus, the combination of SrCl₂ with CB promoted the activation of oocytes matured *in vitro* from agouti resulting in morulae. Finally, with this study, fundamental steps for *in vitro* conservation through reproductive biotechniques were developed in agoutis.

Key words: Artificial activation, *in vitro* embryo production, wild rodents.

INTRODUÇÃO

O termo cutia consiste na denominação comum as espécies de roedores de médio porte pertencentes ao gênero *Dasyprocta*, família *Dasyproctidae*, e ordem *Rodentia*. Dentre estas, a *D. leporina* apresenta uma população estável (EMMONS e REID, 2016) e possui grande relevância na promoção do equilíbrio de ecossistemas, bem como podem ser empregadas como fonte proteica. Além disso, a *D. leporina* é proposta como modelo para conservação de outras espécies de roedores silvestres ameaçados de extinção.

Várias estratégias têm sido desenvolvidas visando a conservação das cutias. Entre estas estratégias, o estabelecimento de técnicas de produção *in vitro* embrião, como a transferência nuclear de células somáticas e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides representa um passo importante para a conservação da espécie. Neste contexto, a ativação artificial de oócitos é uma etapa fundamental para essas técnicas. Além disso, a ativação oocitária possibilita a avaliação da competência das estruturas, além de maiores esclarecimentos sobre os mecanismos do desenvolvimento embrionário e geração de células-tronco embrionárias. Contudo, a ativação artificial tem sua eficiência variável de acordo com o agente utilizado e a espécie (IDRIS *et al.*, 2013).

Especificamente em roedores, a combinação de agentes químicos utilizada para esta finalidade consiste no cloreto de estrôncio (SrCl₂) e citocalasina B (CB) (AZUMA *et al.*, 2018).

Contudo, informações sobre a eficiência de protocolos de ativação em roedores silvestres ainda são escassas, sendo interessante identificar os efeitos destes agentes em oócitos de cutias. Portanto, o objetivo foi avaliar o potencial do SrCl₂ em combinação com CB como ativadores oocitários em *D. leporina*, visando a produção de embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

Bioética e animais experimentais

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA/UFERSA, nº 21/2019) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, nº 71837-1). Um total de três cutias adultas pertencentes ao Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA) foram utilizadas.

Recuperação oocitária, maturação *in vitro* (MIV) e avaliações da MIV

Para recuperação oocitária, ovários de 3 indivíduos previamente anestesiados e eutanasiados foram transportados ao laboratório em NaCl 0,9% a 35–37 °C por 1h. No laboratório, oócitos recuperados por meio de fatiamento ovariano foram sendo considerados viáveis aqueles com citoplasma homogêneo e com pelo menos uma camada de células do *cumulus* (FERRAZ *et al.*, 2020). Para MIV, oócitos viáveis foram incubados por 24 h em TCM 199 contendo 0,23 mM de piruvato de sódio, 100 µM de cisteamina, 10% de soro fetal bovino, 10µg/mL de FSH e 1% de antibióticos em 5% CO₂.

Após a MIV, a expansão das células do *cumulus* foi avaliada usando estereomicroscópio. Em seguida, células do *cumulus* foram removidas usando 0,1% de hialuronidase e a viabilidade foi avaliada usando azul de tripan (0,2%). Oócitos foram avaliados em estereomicroscópio quanto a presença do primeiro corpúsculo polar (1CP).

Ativação artificial, desenvolvimento embrionário e avaliações

Para a ativação artificial e produção de embriões, oócitos foram incubados na presença de 10mM de SrCl₂ e 5µg/mL de CB por 6 h em meio Tyrode Albumina Lactato Piruvato livre de cálcio (TALP). Após esse período, as estruturas foram incubadas em meio Fluido Sintético de Oviduto (SOF) a 38,5 °C em 5% CO₂ (FERRAZ *et al.*, 2020). Quanto às avaliações do desenvolvimento embrionário, estruturas foram analisadas quanto à cinética de desenvolvimento as 48, 120 e 168 h usando microscopia de luz.

Análise Estatística

Finalmente, os dados foram expressos em média±erro padrão de três repetições e foram analisados usando o software StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade pelo teste de Levene. A significância foi estabelecida para p< 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as repetições, um total de seis ovários resultou em 56 oócitos imaturos, perfazendo uma média de 18,7±7,2 oócitos por animal. Destes, quatro oócitos foram

considerados não viáveis e 52 foram considerados viáveis, representando 92,8% de recuperação de oócitos aptos para a MIV. Em geral, a recuperação e qualidade de oócitos derivados de roedores silvestres têm sido variáveis e afetadas por fatores como a espécie e a técnica de recuperação. Ferraz *et al.* (2016) obtiveram uma média $17,0 \pm 1,9$ oócitos por *D. prymnolopha*, sendo deste 9,7% oócitos viáveis. Já Barros *et al.* (2020) obtiveram uma recuperação de 4,4 oócitos em pacas (*Cuniculus paca*) usando a técnica de laparoscopia.

Após a MIV, uma taxa de $93,3 \pm 4,5\%$ (42/45) de expansão das células do *cumulus* foi observada em oócitos de *D. leporina*, tendo tais células apresentado uma viabilidade superior a 90% [$91,2 \pm 2,0\%$ (227/249)]. Além disso, os oócitos apresentaram uma taxa de maturação pela visualização do 1CP de $37,3 \pm 7,7\%$ (19/51) (Fig. 01). Nossos resultados foram superiores àqueles observados em *D. prymnolopha*, os quais os autores obtiveram 27,4% de oócitos maturados (FERRAZ *et al.*, 2020). Em geral, o meio de MIV pode influenciar nesses resultados, sendo observado que a presença do FSH em sua concentração ideal é essencial no estabelecimento de melhores taxas. No presente estudo, nós empregamos $10 \mu\text{g/mL}$ de FSH, concentração usada em camundongos (LIN *et al.*, 2011).

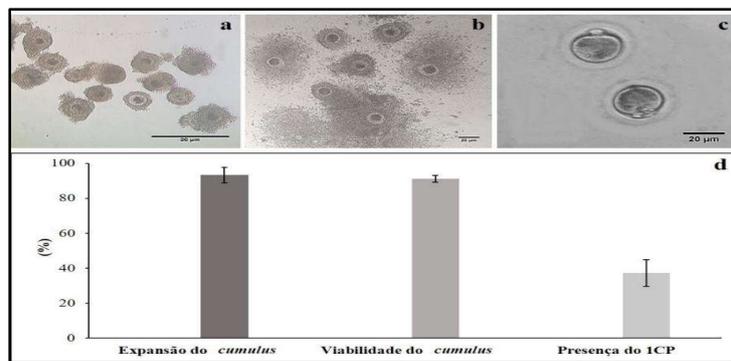


Fig. 01: Recuperação e maturação *in vitro* oocitária de *D. leporina*. (a) oócitos imaturos; (b) células expandidas e (c) oócitos com presença de 1CP; (d) Valores quantitativos.

Quanto ao desenvolvimento embrionário, foi observado $43,2 \pm 14,7\%$ (19/44) de estruturas clivadas, $6,8 \pm 2,3\%$ (3/44) de mórulas em relação ao número de oócitos e $18,8 \pm 9,0\%$ (3/16) de mórulas em relação ao número de estruturas clivadas (Fig. 02).

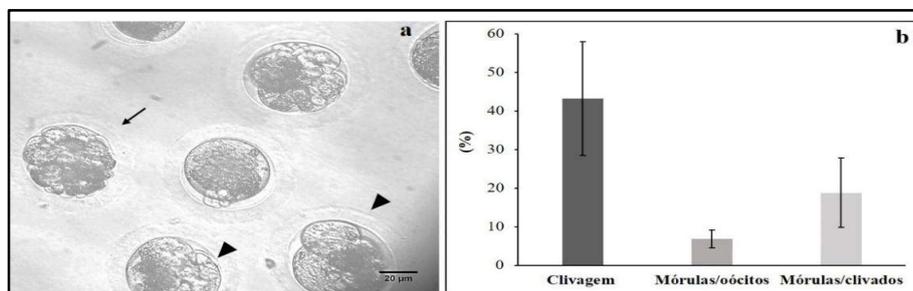


Figura 02: Avaliação do desenvolvimento embrionário em *D. leporina*. (a) Clivagens e mórulas. (b) Valores quantitativos. (Obs.: [cabeça de seta] estruturas clivadas, [seta] mórula)

Este foi o primeiro estudo de produção de embriões partenogênicos usando uma combinação química (SrCl_2 e CB) empregada usualmente em camundongos. Em geral, SrCl_2 atua induzindo a múltiplas oscilações similarmente ao que ocorre na fecundação e a CB inibe a

extrusão do 2CP mantendo a diploidia do embrião (MA *et al.*, 2005). Ferraz *et al.* (2020) empregado uma combinação de ionomicina e 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) usada em bovinos, obtiveram taxas de clivagem de 63,6% (21/33) com 15,1% (5/33) de mórulas em *D. prymnolopha*.

CONCLUSÕES

Portanto, conclui-se que a combinação de SrCl₂ com CB foi capaz de ativar oócitos maturados *in vitro* de *D. leporina* resultando em embriões em estágio de mórula. Ainda, com este estudo, etapas iniciais e fundamentais para conservação *in vitro* usando biotécnicas reprodutivas têm sido desenvolvidas em cutias.

REFERÊNCIAS

- AZUMA, R.; MIYAMOTO, K.; OIKAWA, M.; YAMADA, M.; ANZAI, M. Combinational treatment of trichostatin A and vitamin c improves the efficiency of cloning mice by somatic cell nuclear transfer. *Journal of Visualized Experiments*, v.134, p.e57036, 2018.
- BARROS, F.F.P.D.C.; TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA-NAKAGHI, L.C.; USCATEGUI, R.A.R.; LIMA, M.R.; SANTOS, V.J.C.; ROSSY, K.C.; BORGES, L.P.B.; MACHADO, M.R.F.; VICENTE, W.R.R. Ovum pick-up and *in vitro* maturation in spotted paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766). *Reproduction in Domestic Animals*, v.55, p.442–447, 2020.
- EMMONS, L.; REID, F. *Dasyprocta leporina*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2016.
- FERRAZ, M.S.; CARVALHO, M.A.M.; MORAES, J.; FEITOSA, M.L.T.; BERTOLINI, M.; ALMEIDA, H.M.; BEZERRA, P.G.T.; PIRES, L.C.; ALBUQUERQUE, D.M.N. *In vitro* maturation of agoutis (*Dasyprocta prymnolopha*) oocytes followed by *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.72, p.443–451, 2020.
- FERRAZ, M.S.; JÚNIOR, M.F.J.; FEITOSA, M.L.T.; ALMEIDA, H.M.; BEZERRA, D.O.; PESSOA, G.T.; ALBUQUERQUE, D.M.N.; CARVALHO, M.A.M. Técnica de fatiamento do ovário para obtenção de oócitos em cutias (*Dasyprocta Prymnolopha*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, p.204–208, 2016.
- IDRIS, S.K.; ABDULLAH, R.B.; EMBONG, W.K.; RAHMAN, M.M. Comparison between different combinations of chemical treatment on parthenogenetic activation of mouse oocytes and its subsequent embryonic development. *Animal Cells and Systems*, v.17, p.196–202, 2013.
- LIN, Y.H.; HWANG, J.L.; SEOW, K.M.; HUANG, L.W.; HSIEH, B.C.; CHEN, H.J.; TZENG, C.R.; BAI, C.H. Effect of incubation with different concentrations and durations of FSH for *in vitro* maturation of murine oocytes. *Reproductive Biomedicine*, v.23, p.111–117, 2011.

MA, S.F.; LIU, X.Y.; MIAO, D.Q.; HAN, Z.B.; ZHANG, X.; MIAO, Y.L.; YANAGIMACHI, R.; TAN, J.H. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1142–1157, 2005.

ZHU, X.L.; LI, S.F.; ZHANG, X.Q.; XU, H.; LUO, Y.Q.; YI, Y.H.; LI-JUAN, L.V.; ZHANG, C.H.; WANG, Z.B.; OUYANG, Y.C.; SCHATTEN, H.; HOU, Y. Synaptotagmin 1 regulates cortical granule exocytosis during mouse oocyte activation. *Zygote*, v.28, p.97–102, 2019.