



Maturação *in vitro* de oócitos de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831) seguida de fertilização *in vitro* e ativação partenogenética

[*In vitro* maturation of agoutis (*Dasyprocta prymnolopha*) oocytes followed by *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation]

M.S. Ferraz^{1,2}, M.A.M. Carvalho^{1,2}, F.J. Moraes Júnior³, M.L.T. Feitosa³,
M. Bertolini⁴, H.M. Almeida^{2,5}, D.O. Bezerra^{2,6}, G.T. Pessoa^{2,7},
L.C. Pires⁸, D.M.N. Albuquerque⁹

¹Universidade Federal do Piauí - Teresina, PI

²Programa de pós-graduação - Universidade Federal do Piauí - Teresina, PI

³Universidade Estadual do Maranhão - São Luís, MA

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS

⁵Universidade Federal do Piauí - Bom Jesus, PI

⁶Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - Paulistana, PI

⁷Faculdade Maurício de Nassau - Teresina, PI

⁸Universidade Federal do Sul da Bahia - Teixeira de Freitas, BA

⁹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - Campo Maior, PI

M.S. Ferraz
<https://orcid.org/0000-0002-3162-1729>
M.A.M. Carvalho
<https://orcid.org/0000-0001-9165-7339>
F.J. Moraes Júnior
<https://orcid.org/0000-0002-7431-1835>
M.L.T. Feitosa
<https://orcid.org/0000-0002-9247-8532>
M. Bertolini
<https://orcid.org/0000-0003-0340-6148>
H.M. Almeida
<https://orcid.org/0000-0003-1103-2713>
D.O. Bezerra
<https://orcid.org/0000-0002-7662-2776>
G.T. Pessoa
<https://orcid.org/0000-0002-6285-404X>
L.C. Pires
<https://orcid.org/0000-0002-7818-5899>
D.M.N. Albuquerque
<https://orcid.org/0000-0002-5236-3634>

RESUMO

O objetivo foi avaliar protocolos de maturação *in vitro* (MIV) para oócitos de cutias, seguida de fertilização *in vitro* (FIV) e ativação partenogenética (AP). Os oócitos imaturos (CCOs) foram obtidos por fatiamento do ovário, após OSH, e submetidos a três grupos: MAT - 16 (16 horas de maturação), MAT - 20 (20 horas de maturação) e MAT - 24 (24 horas de maturação), em incubadora de cultivo a 38,8°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. A maturação foi analisada pela presença do primeiro corpúsculo polar. Em seguida, os CCOs maduros foram submetidos à FIV, com período de coincubação dos CCOs e dos espermatozoides de 15h, a 38,8°C e 5% de CO₂, e AP com ionomicina. Os grupos de MIV foram analisados utilizando-se o teste qui-quadrado e, nos experimentos de FIV e AP, foram analisadas a taxa de clivagem e a proporção de desenvolvimento embrionário. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SAS. Houve diferença significativa entre os grupos de maturação, tendo os grupos MAT - 20 e MAT - 24 apresentado maior porcentagem de oócitos maturados *in vitro*. As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário foram de 8,6% e 2,9%, respectivamente, na FIV, e de 63,6% e 15,1%, na AP. Entretanto, nos dois casos, o embrião não passou do estágio de mórula.

Palavras-chave: roedor silvestre, oócito, maturação, fertilização *in vitro*, ionomicina

ABSTRACT

The objective was to evaluate IVM protocols for agouti oocytes, followed by *in vitro* fertilization (IVF) and parthenogenetic activation (PA). The immature oocytes (CCOs) were obtained by slicing the ovary after OSH and submitted to three groups: MAT - 16 (16 hours maturation), MAT - 20 (20 hours maturation) and MAT - 24 (24 hours maturation), in a culture incubator at 38.8°C, with an atmosphere of 5% CO₂ and 95% relative humidity. The maturation was analyzed by the presence of the first polar corpuscle. Then, mature CCOs were submitted to IVF, with co-incubation period of CCOs and spermatozoa from 15h to 38.8°C and 5% of CO₂, and PA with ionomycin. The IVM groups were analyzed using the chi-square test and in the FIV and PA experiment the rate of cleavage and the rate of embryonic development were analyzed. Statistical analysis was performed using the SAS program. There was a significant difference between the maturation groups, and the MAT - 20 and MAT - 24 groups showed a higher percentage of matured oocytes *in vitro*. The rates of cleavage and embryonic development were

Recebido em 13 de novembro de 2018

Aceito em 25 de janeiro de 2019

E-mail: mairasferraz@ufpi.edu.br

8.6% and 2.9%, respectively in FIV and 63.6% and 15.1% in PA. However, in both cases the embryo did not pass beyond the morula stage.

Keywords: wild rodent, oocyte, maturation, *in vitro* fertilization, ionomycin

INTRODUÇÃO

A cutia é um roedor da família Dasyproctidae, gênero Dasyprocta, encontrada desde o sul do México, passando pela América Central até a Argentina, o Uruguai, o Paraguai e por todo o território brasileiro (Deutsh e Puglia, 1988). O interesse crescente no desenvolvimento de pesquisas com essa espécie se deve ao fato de ela exercer importante papel na conservação da biodiversidade, bem como representar um modelo biológico para pesquisas experimentais em outras espécies. Além disso, ela apresenta um excelente potencial zootécnico, o que permite a produção alternativa de proteína animal com baixos custos de manutenção e boa adaptabilidade ao cativeiro (Hosken e Silveira, 2001). Assim, é extremamente importante desenvolver pesquisas que visem elucidar a biologia da reprodução e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução aplicadas a essa espécie, a fim de maximizar sua produção.

No entanto, embora haja um grande número de pesquisas sobre a morfofisiologia da reprodução de cutias, existem poucos estudos específicos sobre tecnologias de reprodução assistida aplicadas às fêmeas dessa espécie. A escassez de pesquisas nessa área deve-se, em parte, à necessidade de um grande suprimento de oócitos para a investigação a respeito dos processos de maturação para posterior aplicação em pesquisas e práticas rotineiras sobre biotécnicas da reprodução.

Nesse contexto, a maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica de reprodução assistida utilizada em diferentes espécies animais, domésticas e silvestres, a qual permite, sob condições artificiais, maximizar o uso dos oócitos (CCOs), de modo a prepará-los para a fertilização e, subsequentemente, para o desenvolvimento embrionário (Gonçalves et al., 2008), permitindo, dessa forma, a obtenção de um número maior de oócitos que o obtido pelo processo natural de ovulação. Diversas pesquisas já demonstraram que oócitos de alta qualidade podem ser obtidos por MIV de oócitos imaturos em folículos antrais para reprodução assistida em

diferentes espécies animais: ratos e camundongos (Anderiesz e Trounson, 1995; Martín-Coello et al., 2008), suínos (Abeydeera et al., 1998; Yuan e Krisher, 2012) e bovinos (Ali et al., 2003), bem como em humanos (Holzer et al., 2007).

Em estudos com roedores (*Mus musculus*, *Mus spretus* e *Mus spicilegus*), observou-se que a MIV apresenta-se como melhor fonte de obtenção de CCOs maduros do que tratamentos de superovulação, visto que o número médio de CCOs/fêmea obtido utilizando MIV foi superior ao número de CCOs/fêmea obtido após superovulação nas três espécies estudadas (Martín-Coello et al., 2008). Estudos de MIV em camundongos têm demonstrado que a extrusão do primeiro corpúsculo polar se inicia oito horas após o início da MIV, mas o número máximo de corpúsculos polares ocorre após 14h de cultivo (Miao et al., 2004). Em chinchilas, Aiudi et al. (2007) obtiveram CCOs por fatiamento do ovário e ao submeterem-nos à maturação *in vitro*, segundo protocolo adotado para bovinos (Dell'Aquila et al., 2002), obtiveram, na primeira etapa do experimento, 75% dos CCOs com maturação meiótica completa, mostrando a segunda metáfase, e, em 25% dos CCOs maturados, houve ativação. Numa segunda etapa experimental, nenhum dos CCOs maturou completamente: 58% deles permaneceram no estágio de vesícula germinal, 17% atingiram metáfase I e 25% apresentaram configuração de cromatina dispersa (Aiudi et al., 2007).

No entanto, nenhum estudo de MIV para obtenção de oócitos de cutias foi relatado na literatura. O desenvolvimento desses protocolos é de grande importância para que as biotécnicas da reprodução possam ser aplicadas, com fins de preservação da espécie pesquisada e, ainda, para outros roedores em perigo de extinção. Dessa forma, objetivou-se avaliar protocolos de MIV para oócitos de cutias, seguida de fertilização *in vitro* (FIV) e ativação partenogenética (AP), e verificar sua eficiência para obtenção de oócitos maduros para produção *in vitro* de embriões de cutias.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em Teresina, PI. Foram utilizadas 17 cutias fêmeas e seis cutias machos (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831), oriundos do Núcleo de Estudos e Preservação de Animais Silvestres (Nepas) da UFPI (Registro de Criadouro Ibama nº 02/08 - 618), com idade e peso médios de 3,9 anos e 2,2kg, respectivamente. Todos os procedimentos nesta pesquisa foram autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI (Protocolo 001/13 – CEEA/UFPI) e pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio), por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (Protocolo nº 36942-1).

As cutias fêmeas foram submetidas a exame ultrassonográfico para excluir os animais gestantes do experimento. As fêmeas não gestantes foram alojadas em baias isoladas dos machos, durante todo o experimento, e foram submetidas a novo exame ultrassonográfico 30 dias após o primeiro, para confirmar o diagnóstico negativo de gestação. Os animais receberam como alimentação ração comercial peletizada (proteína bruta mínima – 12%, extrato etéreo – 1,5%, matéria fibrosa – 12%, matéria mineral – 13%, cálcio – 1,3% e fósforo – 0,4%), além de milho, frutas e verduras regionais da época e água *ad libitum*.

Para a obtenção e avaliação dos CCOs, as cutias foram contidas com auxílio de puçá e levadas ao Laboratório de Pesquisas Morfológicas em Ciência Animal do CCA/UFPI, onde foram submetidas à aplicação da medicação pré-anestésica (meperidina 2mg/kg, via intramuscular profunda). Após 15 minutos, foram aplicados 50mg/kg de cloridrato de quetamina, associados a 1mg/kg de cloridrato de xilazina, por via intramuscular, para indução anestésica. Posteriormente, foi realizada a tricotomia do abdômen, seguida da assepsia local com álcool a 70% e iodo povidona, para que se procedesse à ovariossalpingo-histerectomia (OSH). Os ovários foram cuidadosamente dissecados e pesados individualmente em balança de precisão. Após esse procedimento, os ovários foram transportados até o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, no

CCA/UFPI, em tubo de centrifuga de 15mL, contendo 10mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) à temperatura de 37°C. Então, os ovários foram fatiados individualmente com lâmina de bisturi na placa de Petri de 100 x 15mm (TPP). A procura e a seleção dos CCOs em estereomicroscópio (Nikon SMZ 645), bem como sua classificação, foram realizadas conforme descrito por Ferraz *et al.* (2016). Os CCOs foram identificados e quantificados por cada ovário. Após a contagem, os CCOs foram colocados no meio de manutenção (TQC Holding Plus®).

Por se tratar de uma espécie em que não há relatos de protocolos de MIV, FIV e AP, optou-se pela utilização de protocolos já bem estabelecidos para bovinos, a fim de verificar a eficiência deles para cutias, bem como avaliar a necessidade de adequações posteriores, visando melhorar sua eficiência. Dessa forma, os CCOs obtidos foram submetidos a lavagens em três microgotas, com volume de 100µL, contendo meio de maturação (Nutricell®) com 10% de soro fetal bovino. Após as lavagens, os CCOs foram alocados em placas de Petri 60 x 30mm, com seis microgotas de meio de maturação previamente estabilizadas por duas horas, em incubadora de cultivo (Thermo®) a 38,8°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa.

Os CCOs viáveis foram alocados em três grupos de maturação: MAT - 16 (16 horas de maturação), MAT - 20 (20 horas de maturação) e MAT - 24 (24 horas de maturação), em incubadora de cultivo (Thermo®) a 38,8°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Após o período de maturação, foi realizada a seleção dos CCOs que apresentaram corpúsculo polar, os quais foram desnudados pela exposição por dois minutos à enzima hialuronidase (Sigma H-2251), na concentração de 0,1%. A maturação nuclear foi analisada pela presença do primeiro corpúsculo polar, indicando que o oócito atingiu a fase de metáfase II. Em seguida, eles foram submetidos aos processos de FIV e AP.

Para a FIV, os oócitos maturados foram transferidos, em grupos de 15 a 20, para gotas de 100µL de meio de FIV (Nutricell) com 5% de soro fetal bovino em placas de Petri 60 x 30mm, cobertas com óleo mineral. Os espermatozoides para a FIV foram colhidos de acordo com a

técnica descrita para cutias (Ferraz et al., 2011). Entretanto, foi utilizado como diluente 1mL de meio de FIV, que, em seguida, foi depositado em tubo criogênico de 2mL. Posteriormente, o fluido colhido foi centrifugado uma vez, a 200G, por cinco minutos. O sedimento recuperado foi depositado em tubo criogênico de 2mL contendo meio de FIV. Posteriormente foi homogeneizado e submetido à avaliação quanto à motilidade e ao vigor espermáticos. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos/mL, com meio de FIV, os quais foram adicionados às microgotas contendo os CCOs. O período de coincubação dos CCOs e dos espermatozoides foi de 15h, a 38,8°C e 5% de CO₂, para a produção de embriões. Após esse período, as células do *cumulus* foram removidas do meio FIV por pipetagem.

Na AP, os oócitos que apresentaram corpúsculo polar foram ativados quimicamente com 5µM de ionomicina, em 1mL de meio de manutenção e 2mM de 6-DMAP em 1mL de SOF. Após as passagens, os oócitos foram coincubados por quatro horas, a 38,8°C e 5% de CO₂; em seguida, foram lavados em três microgotas de meio SOF e agrupados em 100µL, sob óleo mineral, por sete dias, a 38,8°C e 5% de CO₂.

O dia da FIV/AP foi definido como dia zero (D0). A clivagem foi avaliada no D2 nos dois

experimentos. Na FIV, foi realizado o “feeding” do meio no D4, adicionando-se 20µL de SOF, com 5% de soro fetal bovino, em seis microgotas, e o resultado da FIV/AP foi avaliado no mesmo dia, enquanto a taxa de blastocistos foi avaliada no D7. No experimento de MIV, os grupos de CCOs maturados foram analisados utilizando-se o teste qui-quadrado para a comparação da proporção de células que atingiram a fase de metáfase II nos três grupos. No experimento de FIV e AP, foram analisadas a taxa de clivagem e a proporção de desenvolvimento embrionário. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa “Statistical Analysis System” (Statistical..., 2002) (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à MIV dos CCOs, foi possível constatar que houve diferença significativa entre os grupos estudados (P<0,05). No grupo MAT - 16, dos 52 oócitos submetidos à maturação, apenas quatro (8,8%) apresentaram corpúsculo polar; já no grupo MAT - 20, 12 dos 53 oócitos (22,6%) apresentaram corpúsculo polar e, em 17 dos 43 oócitos (27,4%) do grupo MAT - 24, observou-se corpúsculo polar (Fig. 1). Os grupos com maior tempo de maturação (MAT - 20 e MAT - 24) apresentaram maior porcentagem de oócitos maturados *in vitro* (Tab. 1).

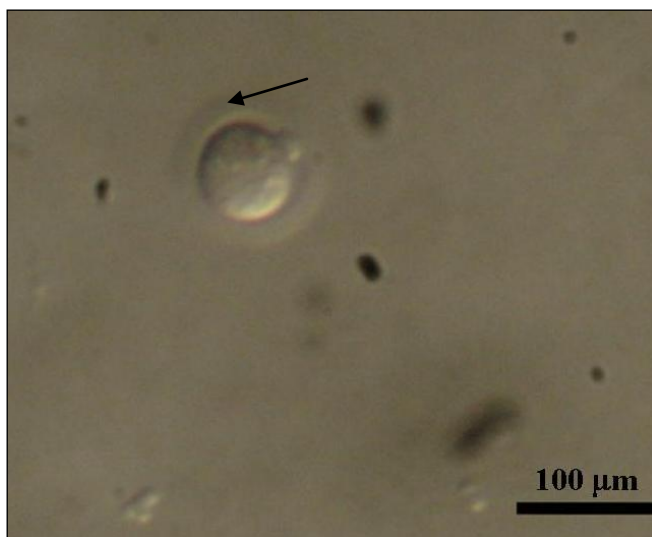


Figura 1. Fotomicrografia de oócito de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) após protocolo de maturação *in vitro*, evidenciando a presença do corpúsculo polar (seta).

Maturação in vitro de...

Tabela 1. Número de oócitos de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) maturados *in vitro*, avaliados pela presença de corpúsculo polar com diferentes tempos de maturação (16, 20 e 24 horas de maturação)

Grupo	Tratamentos		Maturados		Não maturados	
	N	N	N	%	N	%
MAT-16	52	4 ^b	48	8,8	48	91,2
MAT-20	53	12 ^a	41	22,6	41	77,4
MAT-24	62	17 ^a	45	27,4	45	72,6
Total	167	33	-	-	134	-

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de χ^2 ($P < 0,05$). $\chi^2 = 0,0254$.

Em camundongos, estudos têm demonstrado que os tempos de MIV variam entre oito e 21 horas (Miao *et al.*, 2004; Martín-Coello *et al.*, 2008), no entanto a maioria dos protocolos preconizam tempos de 17h para MIV. Já em chinchilas, Aiudi *et al.* (2007) utilizaram protocolo de MIV adotado para bovinos (Dell'Aquila *et al.*, 2002) e obtiveram, inicialmente, uma taxa de maturação de 75%, com tempo de MIV variando entre 28 e 30h. Entretanto, na segunda etapa experimental, nenhum dos CCOs maturou completamente (Aiudi *et al.*, 2007). Em coelhos, os protocolos de maturação preconizam tempos de MIV variando entre 14 e 16h, com taxas de maturação variando entre 45 e 57% (Sugimoto *et al.*, 2012). Em pesquisas sobre MIV de oócitos de rato-veadeiro (*Peromyscus maniculatus*), a maior taxa de maturação foi obtida com 19h de incubação (Choi e He, 2013). Assim, essas discrepâncias evidenciam diferenças fisiológicas aparentes entre as espécies, e possivelmente maior tempo de maturação seja necessário para os oócitos da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*).

As taxas de MIV obtidas neste estudo são menores que as taxas de MIV em outros roedores, especialmente em camundongos. Em três diferentes espécies de camundongos (*M. musculus*; *M. spretus* e *M. spicilegus*), as taxas de maturação variaram entre 86 e 93% (Martín-

Coello *et al.*, 2008). No entanto, muitos fatores podem influenciar a eficiência dos protocolos de MIV. Alguns estudos demonstraram que as condições de cultura, especialmente o meio de cultura, influenciam na eficácia da MIV. Em pesquisas sobre MIV de oócitos de camundongos, as taxas de MIV variaram de 39%, quando o meio de cultura foi MTC 199, para 51,6% e 52,6%, quando o meio de cultura foi o meio convencional de MIV e o meio de cultivo de blastocistos, respectivamente. No mesmo estudo, observou-se que o uso de antioxidantes também pode favorecer o número de oócitos maduros (Kim *et al.*, 2011). Não há relatos na literatura sobre MIV de oócitos de cutias; dessa forma, o protocolo testado nesta pesquisa é a primeira tentativa de cultura *in vitro*. Assim, observa-se que há a necessidade de adaptações do meio de cultivo específicas para cutias, a fim de aumentar a eficiência da técnica.

Na FIV, foi verificado que em D2 houve clivagem do zigoto com a observação de embrião com duas células em 8,6% (3/35) dos CCOs, e em D4 observou-se a presença de mórula em 2,9% (1/35) dos CCOs. Nenhum dos oócitos submetidos à FIV chegou ao estágio de blastocisto em D7, parando seu desenvolvimento no estágio de mórula (Tab. 2).

Tabela 2. Avaliação do desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro* (FIV) e ativação partenogênica em diferentes dias (D2, D4 e D7) em cutias (*Dasyprocta prymnolopha*)

	D2		D4		D7	
	N	%	N	%	N	%
FIV (N=35)	3	8,6	1	2,9	0	0,0
Ativação partenogênica (N=33)	21	63,6	5	15,1	0	0,0
Total (N=68)	24	35,3	6	8,8	0	0,0

Em roedores, taxas de FIV variando entre 84 e 87% foram obtidas em três diferentes espécies de camundongos (*Mus musculus*, *Mus spretus* e *Mus spicilegus*), utilizando-se oócitos maturados

in vitro, resultados similares às taxas de fertilização em oócitos maturados *in vivo* após estimulação hormonal e colhidos da tuba uterina (Martín-Coello *et al.*, 2008). Em estudos com

camundongos híbridos B6CBAF1, os oócitos em metáfase II (MII) foram fertilizados com sucesso *in vitro* e, posteriormente, desenvolveram-se até blastocistos (Biggers, 2012).

No entanto, mesmo para as espécies em que a FIV é bem-sucedida, só é possível obter um desenvolvimento de blastocisto em, no máximo, 40 a 50% dos zigotos. Sugere-se que a redução da competência dos oócitos durante o desenvolvimento *in vitro* seja a principal razão para o reduzido potencial dos embriões produzidos *in vitro* (Krisher, 2004; Sirard et al., 2006). A maioria dos oócitos maturados *in vitro* são obtidos de folículos antrais precoces e, portanto, são meioticamente competentes; no entanto, muitos não atingem um diâmetro ideal do oócito antes da FIV e podem exibir anomalias induzidas pelo meio de cultura no desenvolvimento embrionário, número de células de blastocisto e apoptose (Pennetier et al., 2004; Alizadeh et al., 2005).

Outros fatores também podem interferir na eficiência da FIV. Sabe-se que os oócitos maturados *in vitro* não foram expostos aos fluidos da tuba uterina e isso pode levar a diferenças nas propriedades do oócito ao interagir com os espermatozoides. A zona pelúcida de oócitos ovulados contém um ligante, provavelmente derivado de secreções tubáricas, reconhecido pelos espermatozoides, que está ausente no ovário (Lyng e Shur, 2007). Outra substância presente no líquido tubárico é a taurina, que atua como antioxidante. Em estudos

de MIV e FIV em ratos (Kim et al., 2011), vacas (Fujitani et al., 1997; Guyader-Joly et al., 1998) e coelhos (Li et al., 1993), utilizando meios de cultura suplementados com taurina, demonstraram-se efeitos benéficos dessa substância com melhorias nas taxas de desenvolvimento de blastocistos. Assim, uma análise comparativa de oócitos de cutias maturados *in vivo* e *in vitro* pode sugerir o grau de influência das secreções tubáricas na fertilização dos oócitos.

Os resultados de FIV em camundongos e ratos obtidos até o momento são decorrentes de várias décadas de estudos de muitos pesquisadores para otimizar a condição de cultura para o desenvolvimento embrionário dessas espécies. Entretanto, a pesquisa com embriões em cutia está no estágio inicial e este é o primeiro estudo sobre a FIV de oócitos MII dessa espécie, o que demonstra a necessidade de mais pesquisas sobre meios de cultura utilizados para FIV adaptados a essa espécie, que possibilitará uma melhora na eficiência dessa técnica.

Após o tratamento com ionomicina para AP, também foi possível observar o processo de clivagem (zigoto com duas células) em D2 e de mórula em D4 (Fig. 2), sendo a taxa de clivagem em D2 de 63,6% (21/33) e o desenvolvimento embrionário em D4 de 15,1% (5/33). Entretanto, assim como na FIV, o desenvolvimento do embrião não passou da fase de mórula, e no D7 nenhum blastocisto foi observado (Tab. 2).

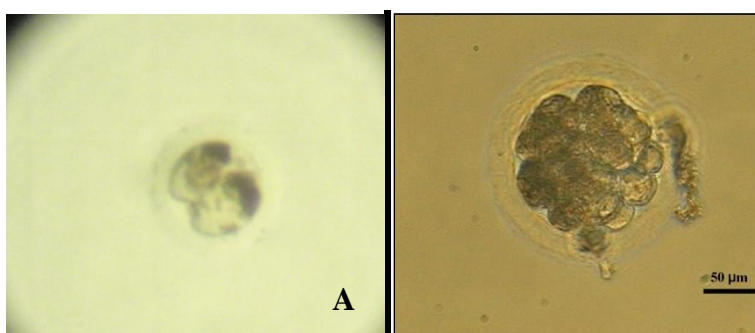


Figura 2. Fotomicrografia demonstrando desenvolvimento embrionário inicial após ativação partenogênica em oócitos de cutia (*Dasyprocta prymnolopha*). A – Observa-se zigoto com duas células após dois dias. B – Observa-se mórula após quatro dias.

Não há relatos de protocolos de AP de oócitos de cutias maturados *in vitro*; dessa forma, por se tratar do primeiro protocolo para a espécie, pode-

se considerar uma boa taxa de ativação. Entretanto, o desenvolvimento do embrião não passou da fase de mórula, assim como descrito

também por Choi e He (2015), em rato-veadeiro (*Peromyscus maniculatus*). Em camundongos, foram obtidos blastocistos após tratamento dos oócitos maturados com cloreto de estrôncio em diferentes concentrações (Ma *et al.*, 2005), assim como em oócitos maturados *in vitro* e submetidos a protocolo de ativação com ionomicina (Heytens *et al.*, 2008).

Ma *et al.* (2005) demonstraram que, quando os oócitos foram submetidos à ativação em meios contendo cálcio, a maioria deles não atingiu a fase de blastocisto, parando seu desenvolvimento nas fases de duas-quatro células ou na fase de mórula. Esse fato ocorre provavelmente devido à penetração do ionóforo de cálcio através dos canais bivalentes, que ocorre da mesma forma que os íons de cálcio, deslocando, assim, os íons de cálcio dentro do oócito e interferindo no meio de ativação (Ma *et al.*, 2005). Portanto, o não desenvolvimento do embrião de cutia até a fase de blastocisto pode estar relacionado com o meio de cultivo *in vitro*.

Outros fatores relacionados ao meio de cultivo também podem interferir no desenvolvimento embrionário. Em estudos com embriões de rato-veadeiro (*Peromyscus maniculatus*), originados de FIV e AP, o uso do sistema de cocultura embrionária com fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) melhorou o desenvolvimento embrionário do estágio de duas células para quatro células, quando foram cultivadas em meio de cultura para células-tronco embrionárias (Choi e He, 2015).

Em pesquisa com gatos que avaliou as taxas de AP, o pré-tratamento das fêmeas com FSH melhorou as taxas de blastocisto quando se comparou com aquelas não submetidas a tratamento hormonal, além de melhorar a qualidade dos embriões partenogênicos. Assim, observa-se que os níveis circulantes de FSH antes da recuperação do oócito desempenham um papel importante na preparação de CCOs para o desenvolvimento embrionário (Veraguas *et al.*, 2017). Considerando que as cutias não foram submetidas a tratamento hormonal prévio e que os níveis circulantes de FSH não foram monitorados, sugere-se que esses fatores podem ter interferido no desenvolvimento embrionário após a ativação partenogênica.

Assim como descrito por Kouamo e Kharche (2015) e Choi e He (2015), quando comparada a eficiência do desenvolvimento embrionário por FIV ou por ativação partenogênica, foi possível observar que tanto a taxa de clivagem (embriões de duas células) em D2 quanto o desenvolvimento embrionário até o estágio de mórula em D4 foram maiores para aqueles CCOs submetidos à ativação partenogênica com ionomicina. Este trabalho representa um passo importante para o desenvolvimento dessas biotécnicas de reprodução para cutias, entretanto mais estudos são necessários para otimizar esses protocolos e obter maiores taxas de maturação oocitária e desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*.

CONCLUSÕES

O protocolo tradicional de MIV para oócitos de bovinos é capaz de maturar oócitos de cutias e é mais eficiente nos tempos de 20 a 24 horas. É possível obter embriões até o estágio de mórula, a partir de oócitos maturados *in vitro*, pelos processos de FIV e AP em cutias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Edital MCTI / CNPq / MEC / Capes – Ação Transversal nº 06/2011 Casadinho / Procad 552400 / 2011-4), pelo financiamento.

REFERÊNCIAS

- ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.58, p.316-320, 1998.
- AIUDI, G.; CINONE, M.; MARITATO, F. *et al.* Rescue and *in vitro* maturation of follicular oocytes in *Chinchilla laniger*. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.19, p.119-324, 2007.
- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, v.59, p.939-949, 2003.

- ALIZADEH, Z.; KAGEYAMA, S.I.; AOKI, F. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: Selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.72, p.281-290, 2005.
- ANDERIESZ, C.; TROUNSON, A.O. The Effect of Testosterone on the Maturation and Developmental Capacity of Murine Oocytes in-Vitro. *Hum. Reprod.*, v.10, p.2377-2381, 1995.
- BIGGERS, J.D. IVF and embryo transfer: historical origin and development. *Reprod. Biomed.*, v.25, p.118-127, 2012.
- CHOI, J.K.; HE, X. Improved oocyte isolation and embryonic development of outbred deer mice. *Sci. Rep.*, v.5, p.12232, 2015.
- CHOI, J.K.; HE, X. *In vitro* maturation of cumulus-oocyte complexes for efficient isolation of oocytes from outbred deer mice. *PLoS. One*, v.8, p.e56158, 2013.
- DELL'AQUILA, M.E.; CASAVOLA, V.; RESHKIN, S.J. *et al.* Effects of b-endorphin and naloxone on *In Vitro* maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.63, p.210-222, 2002.
- DEUTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. R. *Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo*. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 191p.
- FERRAZ, M.S.; MENEZES, D.J.A.; PESSOA, G.T. *et al.* Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). *Theriogenology*, v.75, p.459-462, 2011.
- FERRAZ, M.S.; MORAES JÚNIOR F.J.; FEITOSA, M.L.T. *et al.* Técnica de fatiamento do ovário para obtenção de oócitos em cutias (*Dasyprocta prymnolopha*). *Pesqui. Vet. Bras.*, v.36, p.204-208, 2016.
- FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S. *et al.* Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.483-489, 1997.
- GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A. *et al.* Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.261-291.
- GUYADER-JOLY, C.; GUERIN, P.; RENARD, J.P. *et al.* Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced *in vitro*. *Amino Acids*, v.15, p.27-42, 1998.
- HEYTENS, E.; SOLEIMANI, R.; LIERMAN, S. *et al.* *Reprod. Biomed.*, v.17, p.764-771, 2008.
- HOLZER, H.; SCHARF, E.; CHIAN, R.C. *et al.* *In vitro* maturation of oocytes collected from unstimulated ovaries for oocyte donation. *Fertil. Steril.*, v.88, p.62-67, 2007.
- HOSKEN, F.M.; SILVEIRA, A.C. (Eds.). *Criação de cutias*. Viçosa, MG: Aprenda fácil, 2001. v.4, p.21-22.
- KIM, M.; HONG, S.J.; LEE, J.H. *et al.* Comparison of *in vitro* maturation media of immature oocytes: the effectiveness of blastocyst culture media. *Fertil. Steril.*, v.95, p.554-557, 2011.
- KOUAMO, J.; KHARCHE, S.D. A comparative study of parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization of *in vitro* matured caprine oocytes. *Iran. J. Vet. Res.*, v.16, p.20-24, 2015.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.*, v.82 Suppl., p.E14-E22, 2004.
- LI, J.; FOOTE, R.H.; SIMKI, M. Development of rabbits zygotes cultured in protein free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, v.49, p.33-37, 1993.
- LYNG, R.; SHUR, B.D. Sperm-egg binding requires a multiplicity of receptor-ligand interactions: new insights into the nature of gamete receptors derived from reproductive tract secretions. In: ROLDAN, E.R.S.; GOMENDIO, M. (Eds.). *Spermatology*. Nottingham: Nottingham University Press, 2007. p.335-351.
- MA, S.F.; LIU, X.Y.; MIAO, D.Q. *et al.* Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1142-1157, 2005.
- MARTÍN-COELLO, J.; GONZÁLEZ, R.; CRESPO, C. *et al.* Superovulation and *in vitro* oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology*, v.70, p.1004-1013, 2008.

Maturação in vitro de...

MIAO, Y.; MA, S.; LIU, X. *et al.* Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Devel.*, v.69, p.66-76, 2004.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C. *et al.* Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *Mater*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15* and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes and preimplantation embryos. *Biol.Reprod.*, v.71, p.1359-1366, 2004.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.

STATISTICAL analysis system. Cary: SAS Institute, 2002.

SUGIMOTO, H.; KIDA, Y.; MIYAMOTO, Y. *et al.* Growth and development of rabbit oocytes in vitro: effect of fetal bovine serum concentration on culture medium. *Theriogenology*, v.78, p.1040-1047, 2012.

VERAGUAS, D.; GALLEGOS P.F.; VELASQUEZ, A.E. *et al.* FSH stimulation of anestrous cats improves oocyte quality and development of parthenogenetic embryos. *Theriogenology*, v.87, p.25-35, 2017.

YUAN, Y.; KRISHER, R.L. *In vitro* maturation (IVM) of porcine oocytes. *Methods Mol. Biol.*, v.825, p.183-198, 2012.