

EFEITO DO FLUIDO FOLICULAR E SORO FETAL BOVINO NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS DE CATETOS (*Pecari tajacu*)

PEREIRA, Antonia Beatriz Mendonça¹; SANTOS, Maria Valéria Oliveira²; RODRIGUES, Ana Livia Rocha³; SANTOS, Felipe Alves dos⁴; BARBOSA, Brenna de Sousa⁵; OLIVEIRA, Moacir Franco de⁶; PEREIRA, Alexsandra Fernandes^{7*}

¹Mestrada em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA); ²Pós doutoranda (CNPq), UFERSA; ³Mestranda em Ciência Animal, UFERSA; ⁴Graduando em Biotecnologia, UFERSA; ⁵Doutoranda em Ciência Animal, UFERSA; ⁶Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), UFERSA; ⁷Docente do PPGCA e coordenadora do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), UFERSA *alexandra.pereira@ufersa.edu.br

Resumo

O objetivo foi avaliar o fluido folicular (FF) de cateto e do soro fetal bovino (SFB) na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de catetos, bem como o impacto da fonte proteica no desenvolvimento embrionário *in vitro* (DIV). Os oócitos foram maturados e analisados quanto à extrusão do 1º corpúsculo polar (1CP) e progressão à metáfase II (MII), sendo o meio mais eficiente selecionado para a etapa embrionária. O grupo FF apresentou maiores taxas de 1CP (91,9%) e MII (79,2%), sem diferença estatística em relação ao SFB ($P>0,05$). Na DIV, o FF promoveu 64,4% de clivagem e 23,1% de blastocistos, indicando que ambas as fontes são viáveis para MIV, com destaque para o FF no desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Conservação animal. Embrião. Fonte Proteica. Ungulados silvestres.

Introdução

O cateto é um ungulado pertencente à ordem Artiodátila, distribuído na América (Desbiez et al., 2012). Esta espécie reside em uma ampla diversidade de habitats, que variam de florestas tropicais úmidas a regiões do semiárido (Galetti et al., 2015). Nesses territórios, os catetos podem atuar como indicadores da qualidade ambiental, dispersores de sementes e membros da cadeia alimentar (Desbiez et al., 2012; Galetti et al., 2015). Apesar da grande importância ecológica, as populações de catetos vêm sofrendo uma perda considerável em virtude do aumento da caça ilegal, degradação seu habitat e competição com espécies exóticas (Galetti et al., 2015). Assim, torna-se essencial estudos de conservação da espécie, incluindo investigações sobre seus aspectos reprodutivos e uso de tecnologias reprodutivas.

Neste cenário, as etapas iniciais de manipulação de oócitos, como a maturação *in vitro* (MIV), ainda precisam ser mais bem compreendidas para aplicação efetiva. Borges et al. (2018) iniciaram estudos estabelecendo o tempo de MIV em 44-48 h, período semelhante aos suínos, espécie doméstica filogeneticamente próxima dos catetos. Posteriormente, oócitos foram ativados artificialmente, resultando em 27,6% de blastocistos (Borges et al., 2020). Esses resultados podem ser otimizados, especialmente no que diz respeito a maturação oocitária, a qual é estimulada pelas condições do meio de cultivo.

Nesse contexto, nos primeiros estudos em catetos foi utilizado o soro fetal bovino (SFB) como fonte proteica mais acessível e de uso comum para a maioria das espécies (Borges et al., 2018; 2020). Contudo, a adição do fluido folicular (FF) das fêmeas de cateto como fonte proteica poderia melhorar os resultados da MIV, assim como é comumente realizado na MIV de suínos (Currin et al., 2022).

Objetivos

Avaliar o efeito do fluido folicular e do soro fetal bovino sobre a maturação *in vitro* dos oócitos de catetos, caracterizando as taxas de maturação e desenvolvimento embrionário.

Metodologia

O experimento foi conduzido de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (no. 30/2019) e SISBIO (no. 71834-1). Para tanto, 16 fêmeas de cateto (*Pecari tajacu*) do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA) foram estimuladas quatro dias antes usando PG600® (400 UI de gonadotrofina coriônicas equinas e 200 UI de gonadotrofina coriônica humana, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil). Posteriormente, os animais foram eutanasiados e os ovários coletados transportados ao laboratório (NaCl 9% com 0,05 mg/mL de penicilina a 37 °C). No laboratório, oócitos foram recuperados através da aspiração folicular utilizando meio de manipulação (MCM: TCM199 com 2,2 g/L bicarbonato sódio, 25 mM HEPES, 0,2 mM piruvato de sódio e 1% solução de penicilina-estreptomicina-anfotericina B). Foram selecionados oócitos de grau I e II os quais foram submetidos à MIV nos grupos (FF e SFB) em meio MIV (MCM contendo 20 µg/mL FSH/LH, 10 ng/mL EGF, 100 µM cisteamina e 10% SFB ou 10% FF), durante 44 h.

Decorrido a MIV, oócitos foram desnudos usando a enzima hialuronidase (0,1%) e pipetagens. Em seguida, sob estereomicroscópio, foi avaliada a presença do primeiro corpúsculo polar (1CP), na qual os oócitos que apresentaram o 1CP foram considerados maturados. Posteriormente, todos os oócitos foram marcados com 10 µg/mL Hoechst 33342 por 15 min e avaliados sob microscopia de fluorescência para identificar o estágio nuclear, onde aqueles que apresentaram metáfase II foram considerados maturados.

Em uma segunda fase experimental para avaliar o desenvolvimento embrionário, a MIV foi realizada usando a melhor fonte proteica identificada. Após a MIV, os oócitos com 1CP foram submetidos ao protocolo de ativação artificial, utilizando ionomicina (5 µM) por 5 min, seguida da incubação (38,5 °C e 5,5% CO₂) em 1,9 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) durante 3 h. Em seguida, oócitos foram submetidos ao desenvolvimento (DIV), sendo incubados por 7 dias em meio fluido sintético do oviduto (SOF) suplementado. Durante o DIV, foi avaliada a cinética embrionária. O dia da ativação foi considerado o dia 0 (D0), sendo no dia 3 (D3) avaliada a taxa de clivagem e no dia 7 (D7) a taxa de blastocistos.

Os dados obtidos foram expressos com média ± erro padrão, utilizando o software Star View 5.0. A normalidade e a homoscedasticidade foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As taxas de maturação foram comparadas pelo teste Exato de Fisher, considerando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

Após a MIV, os grupos FF e SFB não apresentaram diferenças significativas em relação à presença do 1CP (Figura 1, $P > 0,05$). Ambos os grupos apresentaram taxas de maturação superiores a 70%, um valor considerado elevado para mamíferos silvestres, uma vez que o sucesso da MIV nesses animais raramente ultrapassa 60% (Santos et al., 2022). Ainda, as taxas de 1CP observadas foram semelhantes as taxas relatadas para suínos (Xu et al., 2020).

Considerando a dificuldade para obtenção de oócitos de catetos, devido a baixa disponibilidade de fêmeas e ausência de uma metodologia estabelecida para coleta *in vivo*, é importante considerar que o FF permitiu um maior número de oócitos maturados. Por essa razão, a ativação artificial e o desenvolvimento embrionário foram realizados apenas para o grupo de oócitos maturados com FF. Nesse grupo, foram observados $64,4 \pm 9,8\%$ de oócitos clivados. Dentre esses, $12,8 \pm 4,0\%$ apresentaram clivagens de 2 células, $84,6 \pm 6,9\%$ de 3 a 7 células e $2,6 \pm 4,2\%$ mais de 8 células. Ainda, foi obtida uma taxa de $23,1 \pm 16,0\%$ de blastocistos/clivados. Esses achados corroboram com o estudo de Borges et al. (2020), que

também aplicaram o mesmo protocolo de ativação artificial em catetos, mas com a MIV realizada com SFB. Esses dados indicam que ambas as fontes proteicas podem ser utilizadas no sistema de MIV, possibilitando a obtenção de taxas satisfatórias para uma espécie silvestre.

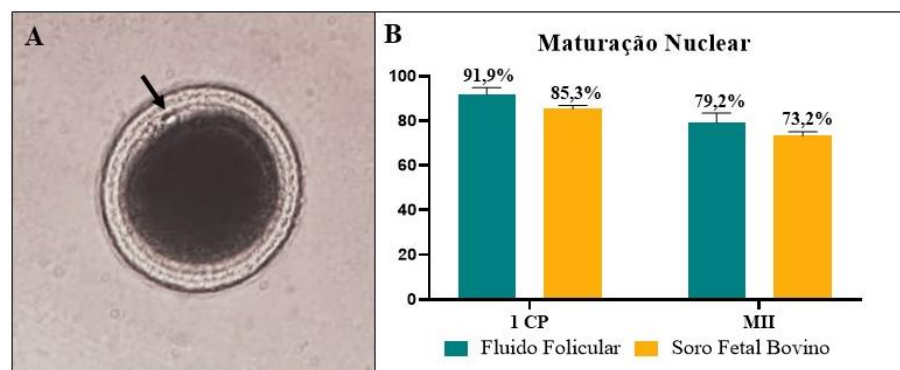


Figura 1. Maturação *in vitro* de oócitos de catetos. **(A)** Imagem representativa do primeiro corpúsculo polar de oócitos de catetos após a MIV. **(B)** Efeito do fluido folicular de cateto e do soro fetal bovino sobre a maturação nuclear de oócitos de catetos.

Conclusão

O FF e o SFB mostram-se eficientes como fontes proteicas para a MIV de oócitos de catetos. Além disso, a MIV realizada com FF é capaz de promover o desenvolvimento de embriões após ativação artificial. Adicionalmente, o presente estudo é fundamental para compreender os próximos passos da produção *in vitro* de embriões em catetos e conservação da biodiversidade.

Referências

- BORGES, A.A. *et al.* In vitro maturation of collared peccary (*Pecari tajacu*) oocytes after different incubation times. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1863–1868, 2018.
- BORGES, A.A. *et al.* Production of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) parthenogenic embryos following different oocyte chemical activation and *in vitro* maturation conditions. **Theriogenology**, v. 142, p. 320–327, 2020.
- CURRIN, L. *et al.* Optimizing swine *in vitro* embryo production with growth factor and antioxidant supplementation during oocyte maturation. **Theriogenology**, v. 194, p. 133–143, 2022.
- DESBIEZ, A.L.J. *et al.* Avaliação do risco de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 74–83, 2012.
- GALETTI, M. *et al.* Diet overlap and foraging activity between feral pigs and native peccaries in the Pantanal. **Plos One**, v. 10, n. 11, e0141459, 2015.
- SANTOS, M.V.O.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Embryo production by *in vitro* fertilization in wild ungulates: progress and perspectives – a review. **Annals of Animal Science**, v. 22, n. 4, p. 1151–1162, 2022.
- XU, H. *et al.* The effect of L-carnitine additive during *in vitro* maturation on the vitrification of pig oocytes. **Cellular Reprogramming**, v. 22, n. 4, p. 198–207, 2020.