

## **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PIOMETRA NA VIABILIDADE DE OÓCITOS CANINOS IMATUROS PELA UTILIZAÇÃO DO AZUL CRESIL BRILHANTE**

*(Evaluation of the effects of pyometra on the viability of immature canine oocytes through the use of brilliant cresyl blue)*

Germano Gonçalves TEIXEIRA\*; Evelyn de Castro PINHEIRO; Dárcio Ítalo Alves TEIXEIRA; Paulo Ricardo de Oliveira BERSANO; Leda Maria Costa PEREIRA

Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.740-000.

\*E-mail: [germanoggt06@gmail.com](mailto:germanoggt06@gmail.com)

### **ABSTRACT**

The bitch is an experimental model of wild and even endangered canids. Therefore, the study of the factors that influence your fertility benefits scientific advances in both segments. Knowing that pyometra is one of the common uterine pathologies in bitches, this work aimed to evaluate the effects of pyometra on the morphology and competence of canine oocytes through the use of Azul Cresil Brilhante (ACB). For this purpose, 1197 canine oocytes that were divided into 2 groups classified as control (healthy) and treatment (pyometra). They were morphologically classified into grade 1 (G1), grade 2 (G2) and grade 3 (G3) and according to the ACB stain as ACB (+) and ACB (-) (not stained). Bitches in the healthy group had higher amounts of total oocytes (795) and better quality (495 oocytes G1) and competence ( $45 \pm 9.8$  ACB (+)). The use of ACB was useful to distinguish the competence of the studied oocytes and can be an auxiliary tool for choosing the best oocytes.

**Key words:** Sanity, canine oocyte quality, supravital dye, bitch.

### **INTRODUÇÃO**

Apesar de Pereira *et al.* (2012) afirmarem que as condições de saúde das fêmeas caninas doadoras parecerem não influenciar as taxas de maturação, Asa *et al.* (2013) observaram que patologias uterinas, como a piometra, não apenas ameaçam saúde de canídeos, mas também sua fertilidade. Geralmente, os oócitos são selecionados usando avaliação morfológica, porém, o desempenho de oócitos selecionados usando apenas este critério é muitas vezes impreciso, dificultando a distinção entre oócitos competentes e em desenvolvimento (OPIELA e KAŹSKA-KSIAŹKIEWICZ, 2013). Esse trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da piometra sobre os parâmetros quanti-qualitativos (morfologia e competência) de oócitos caninos por meio da utilização do ACB.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Aspectos éticos e origem do material em estudo**

Foram utilizados ovários (n=44) de 22 cadelas (11 cadelas híginas ao exame clínico e 11 cadelas diagnosticadas com piometra), sem predisposição de raças, em diferentes fases do ciclo estral, com idades de 1 a 16 anos, pesando entre 2,1 a 9,5kg, obtidas de castrações realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Ceará (HVSBC- UECE). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE) sob o número de protocolo nº 01223326/2019.

### **Colheita e transporte dos tecidos corticais ovarianos**

Após a OSH, os ovários foram transportados imediatamente para o laboratório. Foram submetidos à técnica de slicing para a liberação dos complexos cumulus-oócito (COCs). Os oócitos foram identificados, quantificados sob lupa estereomicroscópica e classificados de acordo com dois métodos: classificação morfológica convencional e ensaio de ACB. Na classificação morfológica convencional, os oócitos foram avaliados conforme a homogeneidade, coloração do citoplasma e número de camadas das células do cumulus segundo Hewitt e England (1997) e divididos em 3 graus: grau 1 (G1): pigmentação escura com uma ou mais camadas completas de células do cumulus; grau 2 (G2): pigmentação clara com camadas incompletas de células do cumulus; grau 3 (G3): pigmentação pálida, sem formato definido e sem células do cumulus aderidas, sendo considerados degenerados.

### **Ensaio com azul cresil brilhante para seleção dos oócitos competentes**

O ensaio do ACB foi baseado no protocolo adotado por El Shourbagy *et al.* (2006). Imediatamente, após a seleção morfológica dos oócitos, os COCs destinados à exposição ao corante (grupo tratamento), provenientes dos ovários de cadelas normais e com piometra, foram incubados em gotas de 200µL de ACB diluído em PBS por um período de 60 minutos. Os COCs foram lavados em três gotas de 200µL de PBS e os oócitos foram classificados de acordo com a coloração, como ACB (+) (citoplasma azulado, sendo considerados competentes) e os oócitos e ACB (-) (citoplasma incolor, considerados menos competentes).

### **Análise estatística**

Os resultados foram avaliados utilizando o teste de qui-quadrado para associar o efeito da coloração pelo ensaio do ACB à viabilidade dos oócitos provenientes de cadelas saudáveis e com piometra. Ademais os oócitos G1, G2 e G3 foram expressos em média ± erro padrão da média (SEM) e passaram pelo teste t de Student. Foram considerados valores significativamente diferentes com 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). Os testes foram realizados pelo software Bioestat 5.0 (2007).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram avaliados 1197 oócitos obtidos das 22 cadelas. No grupo controle (11 cadelas saudáveis), as raças avaliadas foram: SRD, maltês, poodle, shitzu e pinscher, enquanto no grupo piometra foram SRD, pug, schnauzer, poodle, pinscher e dachshund. A média de peso (kg) e o desvio padrão foram  $9,03 \pm 4,8$  no grupo saudável e  $9 \pm 3,34$  no outro grupo. Comparado ao grupo piometra, o grupo controle (cadelas saudáveis) apresentou maior número de oócitos totais e aqueles classificados como G1 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos quanto às avaliações referentes aos oócitos G2 e G3 como demonstrado na Tab. 01.

As cadelas do grupo piometra apresentaram média de oócitos G1 corados inferior àquelas do grupo saudável. No entanto, os outros grupos G2 e G3 não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) como observados na Tab. 02.

**Tabela 01:** Proporção (%) de oócitos conforme classificação morfológica em diferentes condições sanitárias.

Grupo	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	Total n (%)
Normal	495 (62.2) <sup>a</sup>	205 (25.7)	95 (11.9)	795 (100)
Piometra	218 (54.2) <sup>b</sup>	112 (27.8)	72 (17.9)	402 (100)

Valores com diferentes letras sobrescritas em mesma coluna diferiram estatisticamente pelo teste de Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 02:** Porcentagem de oócitos classificados conforme diferentes níveis de impregnação de corante ACB.

Grupo	G1 ACB (+)	G2 ACB (+)	G3 ACB (+)	ACB G3 (-)
Normal	45 ± 9.8 <sup>a</sup>	18.6 ± 5.9	7.8 ± 3.6	0.8 ± 0.3
Piometra	19.8 ± 4.5 <sup>b</sup>	10.1 ± 2.2	3 ± 0.8	3.4 ± 0.9

Valores com diferentes letras sobrescritas em mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Bukowska *et al.* (2010) afirmam que a piometra influencia significativamente no número de oócitos totais, sendo menor nesse estado patológico. Tais resultados corroboraram com os achados encontrados nesse trabalho, no qual a proporção de oócitos obtidos foi maior no grupo controle quando comparado ao grupo tratamento (795 e 402, respectivamente). Carreiro *et al.* (2018) demonstraram que cadelas com piometra obtiveram uma média de oócitos grau 3 (G3) mais que o dobro em relação as médias de oócitos grau 1 (G1) e grau 2 (G2). Contrariamente, em nosso estudo, houve maior proporção de oócitos grau 1 (54,2%). Além das quantidades consideráveis de G1 e G2, todos estes oócitos advindos do grupo piometra apresentaram-se competentes (ACB +), demonstrando que cadelas acometidas de piometra podem proporcionar oócitos competentes e viáveis para o cultivo *in vitro*.

Em nosso estudo houve diferença ( $p < 0,05$ ) quanto ao número de oócitos G1 (495 no grupo controle e 218 no grupo piometra). Já em relação ao oócitos G2 e G3 como demonstrado na Tab. 01 de fato, não houve diferença. Rodrigues e Rodrigues (2003) concluíram que apesar da menor quantidade de oócitos nas cadelas do grupo piometra, aqueles classificados como G1 e G2 tiveram competência nuclear meiótica assim como no grupo controle. Em nossa avaliação da competência de oócitos imaturos pelo corante ACB, foi identificado que no grupo piometra os oócitos G1 e G2 tiveram algum nível de impregnação do corante, ou seja, estando aptos a serem utilizados no cultivo *in vitro*. Isso reforça que apesar das menores quantidades de oócitos no grupo piometra, a competência dos mesmos pode não ter sido afetada pelo estado de saúde dos animais.

Em estudo realizado com oócitos de gatos domésticos, aqueles corados com ACB apresentaram maiores taxas de maturação nuclear e de desenvolvimento embrionário no grupo de oócitos corados com ACB (JEWGENOW *et al.*, 2019). Esses resultados são associados aos nossos achados, já que demonstram que cadelas saudáveis teriam provavelmente maiores chances de completarem a maturação oocitária quando comparadas ao grupo com piometra, já que possuem maior proporção de oócitos corados. Resultados semelhantes foram obtidos por Karamishabankareh & Mirshamsi (2012), que observaram maior índice de embriões que

desenvolveram para estágio de blastocisto em oócitos ACB (+) em relação àqueles ACB (-), demonstrando que o teste de ACB auxiliou a selecionar oócitos mais competentes para produção *in vitro* de embriões do que apenas a seleção morfológica.

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que cadelas com piometra tiveram menores quantidades de oócitos G1 no total, porém o grupo piometra apresentou boa proporção e qualidade de oócitos, conforme classificação morfológica e coloração com ACB. Esses oócitos mostraram-se competentes no grupo piometra e no grupo saudável, sugerindo que os oócitos provenientes dos animais com essa patologia poderiam ter potencial para MIV. Nosso estudo por fim, confirmou que o ACB pode ser um eficiente método para a seleção oocitária e suas posteriores finalidades.

## REFERÊNCIAS

- ASA, C.S.; BAUMAN, K.L.; DEVERY, S.; ZORDAN, M.; CAMILO, G.R.; BOUTELLE, S.; MORESCO, A. Factors associated with uterine endometrial hyperplasia and pyometra in wild canids: implications for fertility. *Zoo Biology*, v.99, n.1, p.1-12, 2013.
- CARREIRO, A.N.; SOUZA, J. G.; LA SALLES, A.Y.F.; FALCÃO, B.M.R.; ARAÚJO, D.V.F.; DINIZ, J.A.R.A.; ROCHA, E.F.; ARAÚJO, N.L.S.; MENEZES, D.J.A. Obtenção de oócitos em cadelas e gatas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. *Pubvet*, v.12, n.6, p.1-6. 2018.
- HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of pre-ovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitch. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.51, supl.51, p.83-91. 1997.
- JEWGENOW, K.; FERNANDEZ-GONZALEZ, L.; JÄNSCH, S.; VIERTEL, D.; ZAHMEL, J. Brilliant cresyl blue staining allows the selection for developmentally competent immature feline oocytes. *Theriogenology*, v.126, n.1, p.320–325, 2019.
- KARAMISHABANKAREH, H.; MIRSHAMSI, S.M. Selection of developmentally competent sheep zygotes using the Brilliant Cresyl Blue (ACB) test after IVF. *Small Ruminant Research*, v.105, n.1, p.250-254, 2012.
- OPIELA, J.; KAŹSKA-KSIAŻKIEWICZ, L. The utility of Brilliant Cresyl Blue (ACB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). *Reproductive Biology*, v.13, n.3, p.177-183, 2013.
- PEREIRA, L.M.C.; BICUDO, S.D.; LOPES, M.D. Oocyte maturation in bitches. *Animal Reproduction*, v.9, n.3, p.205-209. 2012.