
QUANTIDADE DE OÓCITOS OBTIDOS EM FÊMEAS CANINAS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS EM DIESTRO E ANESTRO

Amount of oocytes obtained from canine females at different ages in diestrous and anestrus

Ângela Patrícia Tucholski^a, Diego Lopes Raschelli^a, Rosana de Nogueira Morais^b, Ana Laura Angeli^c, Tais Marchand Moreira Rocha^d, Neide Tanaka^e

^a Alunos de graduação do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR - Brasil, email: angela_tuc@hotmail.com; di_lopes@terra.com.br

^b Médica Veterinária, Professora Doutora do Departamento de Fisiologia da UFPR, Curitiba, PR - Brasil, email: moraisrn@ufpr.br

^c Médica Veterinária, Professora Doutora de Fisiologia Veterinária da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: ana.angeli@utp.br

^d Médica Veterinária, Professora MSc de Clínica Médica de Pequenos Animais da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: taismr@hotmail.com

^e Médica Veterinária, Professora Doutora de Técnica Operatória e Clínica Cirúrgica da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: neide.tanaka@utp.br

Resumo

O objetivo da presente pesquisa foi identificar a influência da idade e da fase do ciclo estral sobre a contagem de oócitos em cadelas. Foram utilizadas 15 fêmeas entre 1 e 8 anos de idade, divididas em dois grupos: doadoras jovens – JvG (1 – 2,5 anos; n=6) e doadoras adultas – AdG (3 – 8 anos; n=9). Após a identificação da fase do ciclo estral, os grupos foram subdivididos em JvGd – jovens em diestro, JvGa – jovens em anestro, AdGd – adultas em diestro e AdGa – adultas em anestro. A citologia vaginal foi realizada para a identificação da fase do ciclo estral de cada indivíduo. Imediatamente após a ovariossalpingohisterectomia, os ovários foram cuidadosamente dissecados e armazenados em frascos contendo PBS enriquecido com sulfato de estreptomicina e sal sódico de penicilina G. A seguir, foi feita a contagem de oócitos pelo método manual de picotagem. A citologia vaginal identificou que as fases do ciclo estral foram diestro e anestro, sendo que 54% estavam na fase do diestro e 46% na fase de anestro. O JvG apresentou 12,6±9,4 oócitos e o AdG, 7,1±6,5. Após a determinação da fase do ciclo estral das fêmeas jovens e adultas e, com isso, a identificação dos subgrupos, os valores encontrados foram: JvGd: 18,6±8,9 oócitos, JvGa: 6,6±5,6 oócitos, AdGd: 10±7,6 oócitos e AdGa: 3,5±2,5 oócitos. Na classificação etária proposta na pesquisa, não houve diferença significativa em relação à capacidade de doação de oócitos em fêmeas jovens e adultas, bem como não houve influência das fases de diestro e anestro nesta capacidade.

Palavras-chave: Citologia vaginal; Ciclo estral; Ovócitos; Cadelas.

Abstract

The aim of this research was identify the influence of age and of estrous cycle in oocyte count in bitches. Fifteen females between 1 and 8 years old were used. They were divided in two groups: young donors – JvG (1 – 2.5 years; n=6) and adult donors – AdG (3 – 8 years; n=9). After identification of the estrous cycle phase, the groups were subdivided in JvGd – young in diestrus, JvGa – young in anestrus, AdGd –adults in diestrus and AdGa – adults in anestrus. Vaginal cytology was performed for identification of estrous cycle phase in each individual. Immediately after surgery, ovaries were dissected and kept in bottles containing PBS enriched with antibiotics. The oocyte count was carried out using the slicing method. The cytology identified diestrus or anestrus, in which 54% of the females were in diestrus and 46% in anestrus. JvG displayed 12.6 ± 9.4 oocytes and AdG 7.1 ± 6.5 oocytes. After determining the estrous cycle phase, the values obtained were: JvGd: 18.6 ± 8.9 oocytes, JvGa: 6.6 ± 5.6 oocytes, AdGd: 10 ± 7.6 oocytes and AdGa: 3.5 ± 2.5 oocytes. According to the used age classification, there was no significant difference related to oocyte donor capacity in young or adult females, as well as, there was no influence of diestrus and anestrus in this ability.

Keywords: Vaginal cytology; Estrus cycle; Oocytes; Bitch.

INTRODUÇÃO

O estudo aprofundado da fisiologia da reprodução da espécie canina doméstica tem sido cada vez mais realizado, visando à utilização deste modelo experimental para a preservação do material genético de diversas outras espécies de canídeos selvagens (FELDMAN; NELSON, 1996), bem como da recuperação do material genético de fêmeas com doenças importantes do sistema reprodutivo (HISHINUMA et al., 2004).

A citologia vaginal esfoliativa tem sido utilizada como ferramenta útil para o estudo das fases do ciclo estral em cadelas. A técnica também pode ser utilizada como auxílio diagnóstico em certas doenças infecciosas, inflamatórias e tumorais (TAMMER et al., 1994; BENETTI et al., 2004; PÉREZ et al., 2005). Essa técnica é baseada na avaliação de alterações nas características morfológicas e de coloração das células durante o período do ciclo estral, que ocorre devido à influência hormonal, principalmente do estrogênio (FELDMAN; NELSON, 1996).

As células do epitélio vaginal são classificadas, das camadas mais profundas para as mais superficiais, em parabasais, intermediárias, intermediárias superficiais e superficiais (FELDMAN; NELSON, 1996). A parabasal é a pequena, com núcleo arredondado, contendo cromatina e cujo citoplasma é basófilo. As células intermediárias são maiores e arredondadas, classificadas como pequenas ou grandes, possuem menor relação núcleo/citoplasma e o citoplasma basófilo está presente. As células intermediárias superficiais estão situadas numa camada mais superficial e aparecem parcialmente cornificadas com um núcleo picnótico e o citoplasma é acidófilo. As células superficiais são as mais diferenciadas no epitélio vaginal, possuem ângulos e não apresentam núcleo. Seu citoplasma é totalmente acidófilo (TAMMER et al., 1994; PERÉZ et al., 2005).

Atualmente, o interesse no estudo da maturação e fertilização de oócitos de cães *in vitro* tem aumentado consideravelmente. Com isso, várias técnicas para sua obtenção têm sido relatadas (FUJI et al., 2000; ROCHA et al., 2006; SONGSASEN; WILDT, 2007). Fatores como idade e raça podem influenciar na capacidade da fêmea em produzir oócitos viáveis para a utilização em técnicas de fertilização *in vitro* (DURRANT et al., 1998; ROCHA et al., 2006). A fase do ciclo estral parece não influenciar a contagem de oócitos (RODRIGUES; RODRIGUES, 2003), mas sim sua capacidade de maturação em diversos meios de cultura (FUJII et al., 2000).

O objetivo da presente pesquisa foi identificar a influência da idade e da fase do ciclo estral sobre a contagem de oócitos em cadelas.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi conduzido depois de devida aprovação pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Tuiuti do Paraná em parceria com o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Paraná.

As fêmeas utilizadas no experimento foram trazidas ao Hospital Veterinário da Universidade Tuiuti do Paraná para a realização da cirurgia de ovariosalpingohisterectomia. Antes da realização do procedimento cirúrgico, elas foram identificadas pela raça, pelagem e idade.

Foram utilizadas 15 fêmeas entre 1 e 8 anos de idade, que foram divididas em dois grupos: doadoras jovens – JvG (1 – 2,5 anos; n=6) e doadoras adultas – AdG (3 – 8 anos; n=9). Após a identificação da fase do ciclo estral, os grupos foram subdivididos em JvGd – fêmeas jovens em diestro, JvGa – fêmeas jovens em anestro, AdGd – fêmeas adultas em diestro e AdGa – fêmeas adultas em anestro.

O exame físico foi composto da avaliação do peso, escore corporal, presença de ectoparasitas, sinais externos de cio ou gestação intercorrentes.

A citologia vaginal foi realizada com uso de espéculo vaginal e swab estéril (MONTEIRO et al., 2002). Após a confecção da lâmina, ela foi corada com método Panótico, técnica utilizada no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Tuiuti do Paraná. Cada lâmina foi então avaliada para a presença de células de descamação vaginal visando à identificação da fase do ciclo estral de cada indivíduo.

Os animais foram então submetidos à anestesia geral e realização da ovariosalpingohisterectomia. Imediatamente após a retirada de ambos os ovários, estes foram cuidadosamente dissecados e armazenados em frascos contendo solução tampão fosfato alcalino (PBS) enriquecida com 0,05 g/L de sulfato de estreptomicina e 0,05 g/L de sal sódico de penicilina G. Os frascos, devidamente identificados para cada indivíduo, foram congelados para posterior realização da contagem de oócitos.

A contagem de oócitos, procedeu-se por método manual, como citado por ROCHA et al. (2006), com as seguintes etapas:

1. Descongelamento da amostra em temperatura ambiente;
2. Cortes nos ovários foram feitos com lâmina de bisturi, em um placa de Petri contendo citrato de sódio;
3. Colocação do material em tubos ependorf que foram centrifugados por 10 minutos em 2 rpm (modo 0,3);
4. Colocação do sobrenadante em outra placa de Petri levada à estufa por 15 minutos em temperatura de 37° C, 5% de dióxido de carbono e umidade máxima;
5. Redistribuição do material em tubos ependorf e manutenção por 15 minutos no vórtex;
6. Colocação da amostra final em placa de Petri para a visualização dos oócitos maduros e possivelmente viáveis através de lupa;
7. Retirada dos oócitos viáveis com micropipeta e posterior contagem.

Os dados foram analisados estatisticamente pelos métodos de Qui-Quadrado¹ para análise dos grupos JvG e AdG, e teste de Mann Whitney¹ para os grupos JvGd, JvGa, AdGd e AdGa. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

¹ GraphPad InStat

RESULTADOS

Das 15 fêmeas, 10 apresentaram ectoparasitas, dentre eles pulgas, carrapatos e sarna. Cinquenta por cento destas apresentaram escore corporal baixo ou muito baixo.

Na citologia vaginal, as células mais comumente encontradas foram as parabasais e intermediárias, bem como neutrófilos em alguns casos. Nenhum esfregaço mostrou a presença de hemácias e células superficiais. Das lâminas, 40% também apresentaram células intermediárias superficiais. Portanto, as fases predominantes do ciclo estral foram diestro e anestro, sendo que 54% estavam na fase do diestro e 46% na fase de anestro.

O JvG apresentou um total de 70 oócitos, com média de 12,6 e o AdG um total de 68 oócitos, com média de 7,1 (Figura 1). Após a determinação da fase do ciclo estral das fêmeas jovens e adultas e, com isso, a identificação dos subgrupos, os valores encontrados foram: JvGd: $18,6 \pm 8,9$ oócitos, JvGa: $6,6 \pm 5,6$ oócitos, AdGd: $10 \pm 7,6$ oócitos e AdGa: $3,5 \pm 2,5$ oócitos (Figura 2).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de fêmeas jovens e adultas e nem após a classificação em relação à fase do ciclo estral.

Os resultados estão expostos na Tabela 1.

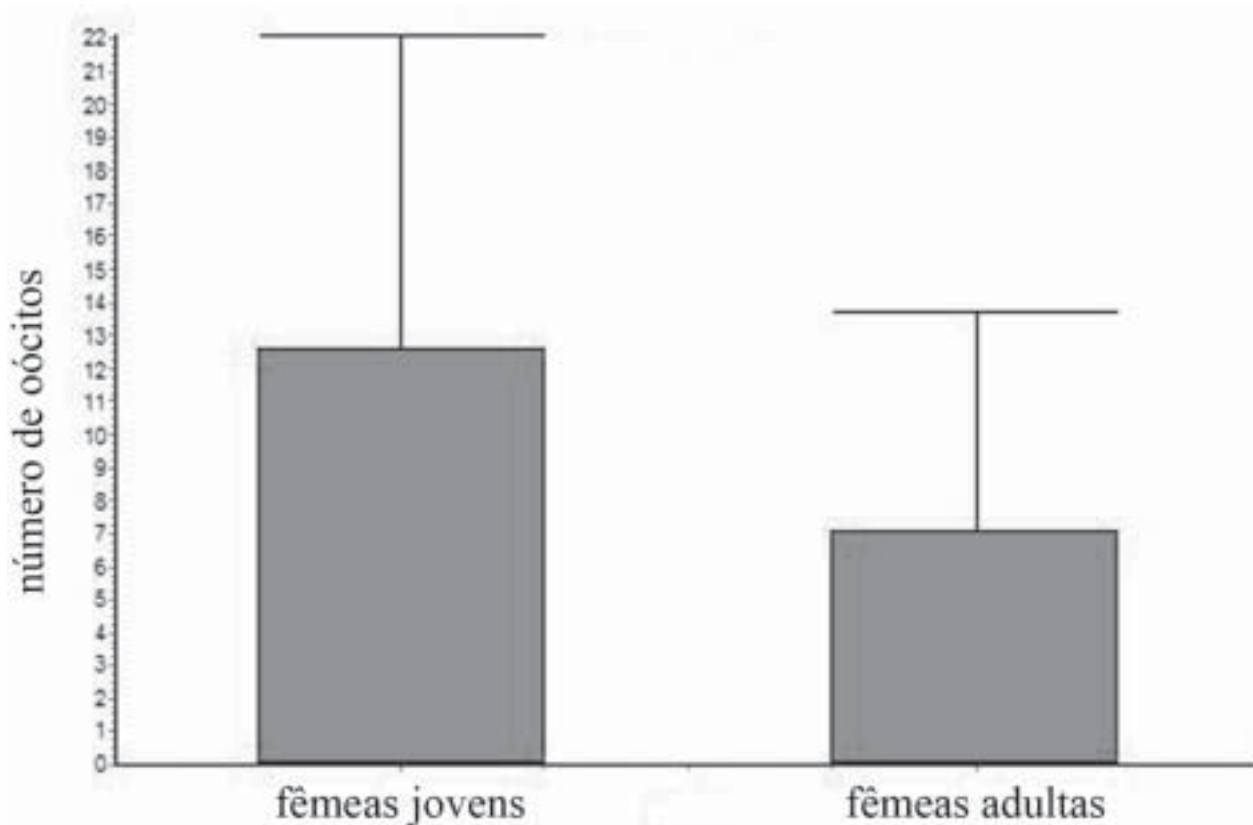


FIGURA 1 - O gráfico mostra a média e o desvio padrão para a contagem de oócitos nas fêmeas jovens (coluna A) e fêmeas adultas (coluna B), com valores respectivos $12,6 \pm 9,4$ e $7,1 \pm 6,5$

Figure 1 - Graphic showing mean and standard deviation of oocyte count in young female (column A) and adult female (column B), with values of 12.6 ± 9.4 e 7.1 ± 6.5 , respectively

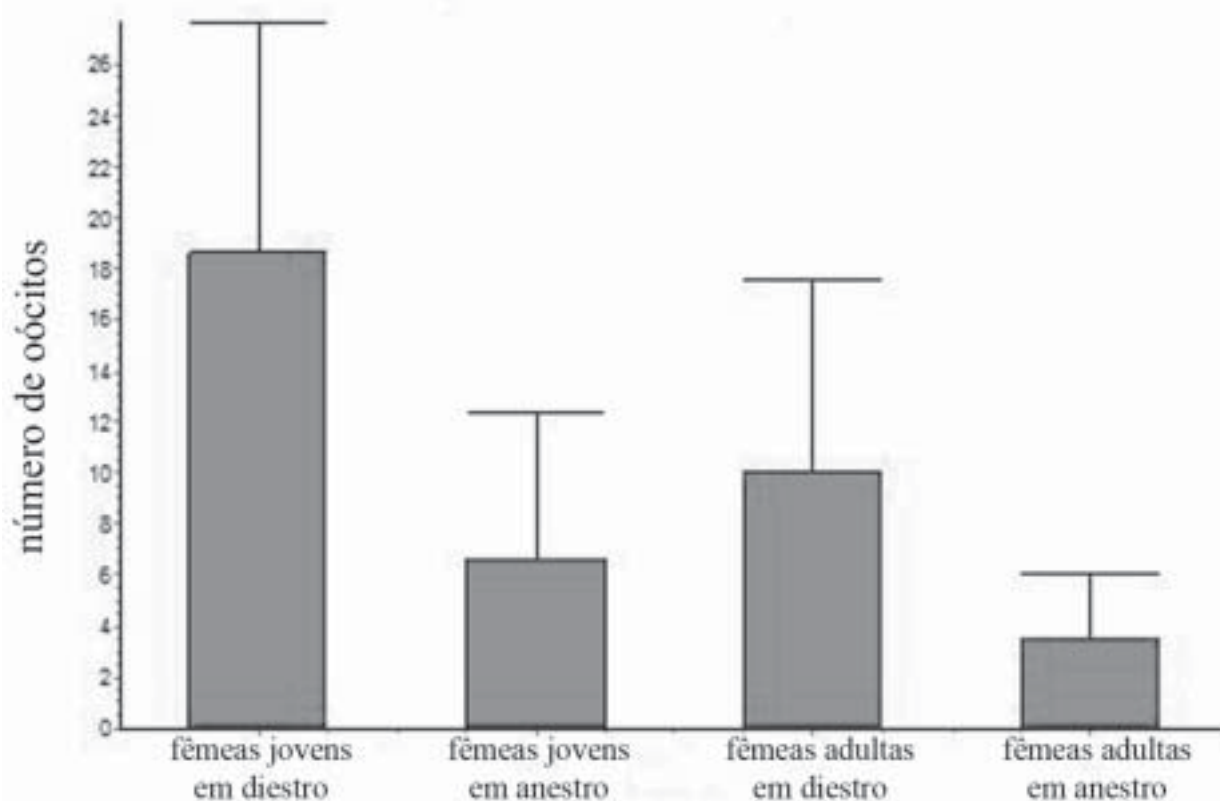


FIGURA 2 - O gráfico mostra a média e o desvio padrão para a contagem de oócitos nas fêmeas jovens em diestro (coluna A), jovens em anestro (coluna B), adultas em diestro (coluna C) e adultas em anestro (coluna D). A: $18,6 \pm 8,9$; B: $6,6 \pm 5,6$; C: $10 \pm 7,6$; D: $3,5 \pm 2,5$

Figure 2 - Graphic showing mean and standard deviation for oocyte count in young female in diestrous (column A), young female in anestrus (column B), adult females in diestrous (column C) and adult females in anestrus (column D). A: 18.6 ± 8.9 ; B: 6.6 ± 5.6 ; C: 10 ± 7.6 ; D: 3.5 ± 2.5

TABELA 1 - Identificação, escore corporal, tipo de células encontradas na citologia vaginal, número de oócitos e a fase do ciclo estral de 15 fêmeas submetidas à cirurgia de ovariosalpingohisterectomia

Table 1 - Data below shows identification, body score and cell type found with vaginal cytology, oocyte number and estrous cycle stage of 15 female dogs submitted to ovariohysterectomy

Identi- ficações	Escore corporal ¹	P ²	I ²	Citologia Vaginal			Hm ²	nº oócitos: (idade em anos)	Fase do ciclo estral
				IS ²	S ²	N ²			
A3	+++	x	x			x		05:(1)	ANESTRO
A4	++		x			x		29:(1)	DIESTRO
A2	++	x						02:(1,5)	ANESTRO
A8	++		x			x		13:(2)	DIESTRO
A13	++	x	x					13:(2,5)	ANESTRO
A12	++		x	x		x		14:(2,5)	DIESTRO
A5	+++		x	x		x		08:(3)	DIESTRO
A10	+	x						01:(3)	ANESTRO
A14	+++		x	x		x		8:(3)	DIESTRO
A1	+++		x	x		x		11:(4)	DIESTRO
A9	+++	x	x					3:(4,5)	ANESTRO
A6	++	x						03:(5)	ANESTRO
A11	+++		x	x		x		22:(6)	DIESTRO
A7	+++		x	x		x		01:(7)	DIESTRO
A15	++	x	x					07:(8)	ANESTRO

1. + (muito magra); ++ (magra); +++ (normal).

2. P: Células Parabasais; I: Células Intermediárias; IS: Células Intermediárias Superficiais; S: Células Superficiais; N: Neutrófilos; Hm: Hemácias.

DISCUSSÃO

Como citado por outros autores (BENETTI et al., 2004), o anestro é a fase de descanso sexual que tem duração média de 4 meses. Durante esse período, a citologia vaginal é composta por predomínio de células parabasais, com alguma presença de células intermediárias. Já o diestro é a fase imediatamente após o estro, onde os níveis de progesterona são elevados e ocorre a predominância de células intermediárias e intermediárias superficiais (PERÉZ et al., 2005), como também observado neste estudo. Esse padrão de descamação celular também é observado em outras espécies de caninos selvagens (MONTEIRO et al., 2002).

Diferentes métodos de coloração têm sido descritos para avaliação da citologia vaginal em cadelas, como Wright's Giemsa (POST, 1985) e Papanicolau (PÉREZ et al., 2005). O método Panótico utilizado na presente pesquisa mostrou-se eficiente para a identificação e classificação das células.

Observou-se que 100% das fêmeas trazidas ao projeto de esterilização, apresentavam-se sem sinais externos de cio ou gestação, confirmados após a realização da citologia vaginal e durante a retirada dos ovários e útero.

A idade da fêmea influencia significativamente no número de oócitos obtidos a partir de seus ovários (DURRANT et al., 1998), sendo que a melhor idade para sua obtenção está em torno de 1 a 6 anos (SONGSASEN; WILDT, 2007) e, ainda, fêmeas de raça pura apresentam significativamente um menor número de oócitos viáveis do que fêmeas cruzadas entre raças diferentes (SONGSASEN; WILDT, 2007). A diferença da idade não foi observada neste estudo, provavelmente porque 100% das fêmeas encontravam-se nessa faixa etária citada pelos autores, ou seja, a melhor época para obtenção de oócitos. Entretanto, apesar disto, e apesar das fêmeas estudadas serem sem raça definida, o número total de oócitos encontrados em cada grupo foi bem menor do que o citado por Hishinuma et al. (2004) e Rocha et al. (2006). Isso pode ter ocorrido devido ao baixo índice de escore corporal da população avaliada.

Corroborando os achados de Fuji et al. (2000) e de Rodrigues e Rodrigues (2003), neste estudo não foi encontrada diferença na contagem de oócitos obtidos nas fases de diestro e anestro, tanto em fêmeas jovens como em fêmeas adultas.

CONCLUSÃO

Na classificação etária proposta na pesquisa, não houve diferença significativa em relação à capacidade de doação de oócitos em fêmeas jovens e adultas, bem como não houve influência das fases de diestro e anestro.

REFERÊNCIAS

BENETTI, A. H.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. Concentrações séricas de progesterona, 17-beta-estradiol e cortisol durante o final do proestro, estro e diestro gestacional em cadelas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 471-478, 2004.

DURRANT, B. S. et al. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 917-932, 1998.

FELDMAN, E.; NELSON, R. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: LEAKY, R. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2nd ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company, 1996.

FUJII, M. et al. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 62, n. 3, p. 305-307, 2000.

HISHINUMA, M. et al. Recovery, morphological quality, and in vitro maturation of follicular oocytes from bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 614-623, 2004.

MONTEIRO, R. V. et al. Serial clinical, colpo-cytological and andocrinological evaluations of *Cerdocyon thous* bitches from the Rio de Janeiro zoo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 2, p. 93-96, 2002.

POST, K. Canine vaginal cytology during estrous cycle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 101-104, 1985.

PÉREZ, C. C. et al. Use of ultrafast Papanicolaou stain for exfoliative vaginal cytology in bitches. **The Veterinary Record**, v. 156, p. 648-650, 2005.

ROCHA, A. A. et al. Quantity and quality of oocytes recovery from donor bitches of different ages. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1465-1467, 2006.

RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 59-66, 2003.

SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 2-22, 2007.

TAMMER, I. et al. The use of exfoliative vaginal cytology for the gynecological evaluation of the bitch. **Tierärztliche Praxis**, v. 22, p. 199-207, 1994.

Recebido: 14/03/2008

Received: 03/14/2008

Aprovado: 14/04/2008

Approved: 04/14/2008