

INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE A QUALIDADE DE OÓCITOS IMATUROS CANINOS

(Influence of age on the quality of immature canine oocyte)

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

¹Faculdade 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

ABSTRACT

Among some factors that influence the quality of canine oocytes, age is well studied. Knowing that the morphological assessment of oocytes is a useful tool for this analysis, the use of new techniques such as the brilliant cresyl blue staining (BCB) increases this assessment. The objective of this work was to analyze the quantity and the oocyte quality of bitches in different age groups through the conventional morphological evaluation, in addition to the bright cresyl blue dye. For this purpose, 2.302 oocytes from 33 bitches were divided into four age groups from 1 to 3 years old; 4-6, 7-10 and over 10 years old and their oocytes were classified as G1, G2 and G3, as well as stained (BCB (+)) and non-stained (BCB (-)). The values were compared using the Kruskal test -Wallis and Dunn post-test, by which it was possible to obtain higher amounts of G1 and BCB (+) oocytes in the range of 1 to 3 years, indicating that this range oocytes have a greater chance of success in fertilization processes and in vitro production, for example.

Key words: Age, canine oocyte, brilliant cresyl blue.

INTRODUÇÃO

Sabe-se que a competência oocitária é influenciada pela idade, um fator que pode afetar a eficiência da produção *in vitro* de embriões, que tem aplicações importantes na conservação de recursos genéticos para reprodução assistida de fêmeas geneticamente valiosas, especialmente aquelas espécies ameaçadas de extinção (ARMSTRONG, 2001).

Nesse contexto, tem havido um interesse considerável no uso de animais jovens para a produção de embriões devido à vantagem que poderia resultar na redução do intervalo de gestação, acelerando assim a taxa de ganho genético alcançável por seleção natural (ARMSTRONG, 2001). Desse modo, o objetivo desse trabalho foi analisar a quantidade e a qualidade oocitária de cadelas em diferentes faixas etárias por meio da avaliação morfológica convencional, além do corante azul cresil brilhante.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos e origem do material em estudo

Para a condução do experimento foram utilizados ovários (n=66) de 33 cadelas saudáveis ao exame clínico, em diferentes fases do ciclo estral (diestro e anestro), que foram divididas em quatro grupos de acordo com as seguintes faixas etárias: 1-3 anos de idade (11 animais), 4-6 anos (9), 7-10 (7) e acima de 10 anos (6). Os ovários foram obtidos da rotina de ovário-salpingo-histerectomia (OSH) do Hospital Veterinário Prof. Sylvio Barbosa Cardoso 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 isolados assepticamente, lavados em meio MEM/HEPES e transportados para o laboratório. Feito isto, foram transferidos para placa de Petri contendo PBS. Os ovários foram seccionados em fatias finas, com lâminas de bisturi ao longo do seu comprimento e largura (*slicing*), para a liberação dos complexos *cumulus*-oócito (COCs). Os oócitos foram identificados, quantificados sob lupa estereomicroscópica (Leica® MZ 12,5) 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 os critérios morfológicos adotados por Hewitt e England (1997) e divididos em três graus: grau 1 (G1): pigmentação escura com uma ou mais camadas completa(s) 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 foram incubados em gotas de 200µL de ACB diluído em PBS (26µM; B-5388; Sigma, St Louis, MO, USA) por um período de 1 hora. Os COCs foram lavados em três gotas de 200µL de PBS e os oócitos foram classificados conforme a coloração, como ACB (+) (citoplasma azulado, sendo considerados competentes) e os oócitos e ACB (-) (citoplasma incolor, menos competentes). A classificação dos oócitos foi realizada sob estereomicroscópio com magnitude de 50x.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média e avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis afim de comparar as populações de oócitos das diferentes faixas etárias, seguido pelo pós-teste de Dunn. Ademais, o teste de Qui-Quadrado foi utilizado para comparar a morfologia. 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 2302 oócitos obtidos das 33 cadelas. O grupo de cadelas de 1 a 3 anos foi o que apresentou maior quantidade de oócitos como demonstrado na Tab. 01.

Em relação aos oócitos classificados de acordo com a coloração de ACB, não foram observados oócitos G1 ACB (-) em nenhum dos grupos com relação à idade. As cadelas do grupo mais jovem (1-3 anos) apresentaram resultado superior ao grupo de idade acima de 10 anos (Tab. 02), nesse caso em relação à competência oocitária.

Tabela 01: Proporção (%) de oócitos conforme classificação morfológica em diferentes faixas etárias.

Idade (anos)	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	Total n (%)
1-3	788 (62,8) ^a	330 (26,3)	135 (10,7)	1253 (100)
4-6	205 (52,2)	105 (26,7)	82 (20,9)	392 (100)
7-10	288 (55,1)	121 (23,1)	113 (21,6)	522 (100)
>10	96 (71,1) ^b	27 (20)	12 (8,8)	135 (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.

Idade (anos)	G1 ACB (+)	G2 ACB (+)	G2 ACB (-)	G3 ACB (+)	G3 ACB (-)
1-3	71,6±17,1 ^a	20,9±6,1	9±6,3	3,7±1,2	8,5±3,5
4-6	22,7±6	11,6±3,3	0	2,8±0,9	6,2±3,1
7-10	41,1±17,3	17,1±9,1	0,1±0,1	5±2,6	11,1±8,6
>10	16±7,7 ^b	4,1±0,6	0,3±0,2	1±0,3	1±0,5

Valores com diferentes letras sobrescritas em mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

Em nossos resultados, foram observadas maiores quantidades de oócitos em cadelas de 1-3 anos, corroborando com o estudo de Lopes *et al.* (2007), que afirmam haver relação entre a idade das cadelas e a proporção de oócitos. Esses autores relataram que cadelas consideradas jovens (1-3 anos de idade) apresentam quantidade superior de oócitos àquelas de idade adulta (4-6 anos) e idosa (>7 anos). No entanto, em nosso trabalho houve diferença ($p < 0,05$) apenas entre o grupo de idade jovem (1-3 anos) e idosa (a partir de 10 anos). Cadelas com idades mais avançadas naturalmente possuem menor número de oócitos. Em estudo de Rocha *et al.* (2006) a produção de oócitos nas cadelas de até 7 anos também foi maior do que aquelas com idades entre 9,5 e 13 anos. Fêmeas com idade superior a sete anos apresentam comprometimento na habilidade de maturação oocitária em relação a animais mais jovens (HEWITT e ENGLAND, 1998).

Não apenas a quantidade, mas a qualidade oocitárias são afetadas pela idade. Em estudo de Rocha *et al.* (2007) atribuiu-se a redução na qualidade de oócitos à medida que a faixa etária de cadelas aumentou, o que poderia estar relacionado às falhas na regulação dos eixos hormonais e à capacidade de fertilização oocitária *in vivo*. Concordando com os resultados de Rocha *et al.* (2006) cadelas adultas, com menos de sete anos de idade (de 1 a 3 anos), possuem um rendimento melhor de oócitos de maior qualidade do que animais muito novos ou muito velhos. A idade do animal influencia tanto o número quanto a qualidade morfológica dos COCs. Os animais mais jovens produzem significativamente mais oócitos com boa qualidade morfológica do que as fêmeas com mais de 4 anos (LOPES *et al.*, 2007).

Ao contrário, de outras espécies, como bovinos, na maturação oocitária canina utiliza-se rotineiramente apenas oócitos G1 já que os G2 apresentam tendência a degenerar durante o cultivo. A importância da seleção de oócitos com base na morfologia foi demonstrada por

Nickson *et al.* (1993) quando foi observado a degeneração de oócitos com apenas uma camada de células do *cumulus*, enquanto parte dos oócitos com mais de uma camada de células do *cumulus* continuava a se desenvolver em cultivo. Segundo Rodrigues *et al.* (2009), a integridade do fenótipo do complexo *cumulus*-oócito é considerada tanto um indicador da sua viabilidade como um potente marcador da capacidade de transcrição de genes envolvidos na maturação e desenvolvimento embrionário inicial.

Apesar de haver vários estudos do ACB com oócitos bovinos, suínos, caprinos há poucos estudos com oócitos caninos, mas sabe-se que a utilização melhora as taxas de sucesso em MIV e PIV (JEWGENOW *et al.*, 2019; KARAMISHABANKAREH e MIRSHAMSI, 2012). Nossos resultados apresentaram que as cadelas do grupo mais jovem tiveram mais oócitos G1 competentes do que cadelas do grupo de idade mais avançada, corroborando com Hewitt e England (1998) que afirmaram que cadelas com idade acima de 7 anos apresentavam comprometimento na habilidade de maturação oocitária em relação a animais mais novos. A coloração de ACB auxiliou a selecionar oócitos mais competentes para PIVE, aumentando seu sucesso do que apenas a seleção morfológica convencional em oócitos ovinos, bem como a maturação oocitária nuclear de gatos domésticos (JEWGENOW *et al.*, 2019; KARAMISHABANKAREH e MIRSHAMSI, 2012).

CONCLUSÕES

Concluimos que cadelas mais jovens dentre 1 a 3 anos possuem oócitos com aspectos quanti-qualitativos melhores do que cadelas com idade superior a 10 anos, baseando-se na contagem, avaliação morfológica e ensaio com ACB dos oócitos. Sugerimos ainda novos estudos que utilizem os mesmos para avaliação de sua viabilidade em procedimentos como MIV e PIVE, posterior à seleção desses oócitos com avaliações combinadas como apresentadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1303–1322, 2001.
- HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology*, v.49, n.5, p.957-966. 1998.
- 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, 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, 250-254. 2012.

LOPES, G.; SOUSA, M.; LUVONI, G.C.; ROCHA, A. Recovery rate, morphological quality and nuclear maturity of canine *cumulus*-oocyte complexes collected from anestrous or diestrous bitches of different ages. *Theriogenology*, v.68, p.821-825, 2007.

NICKSON, D.A.; BOYD, J.S.; ECKERSALL, P.D.; FERGUSON, J.M.; HARVEY, M.J.; RENTON, J.P. Molecular biology methods for monitoring oocyte and in vitro fertilization in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.47, p231-240, 1993.

ROCHA, A.A.; BASTOS, R.; CUNHA, I.C.N.; QUIRINO, C.R. Maturação in vitro de oócitos de cadelas domésticas: efeitos na qualidade oocitária e presença espermática na maturação in vitro. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.102, p.267-284, 2007.