

EFEITO DO BENZOATO DE ESTRADIOL NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS, EMBRIÕES E NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE CADELAS RECÊM ACASALADAS¹

(EFFECT OF ESTRADIOL BENZOATE ON OOCYTES/EMBRYOS RECOVERY AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF MISMATED BITCHES)

**A. P. DERUSSI^{2*}, V. H. CHIRINEA³, Y. KARACCAS⁴, G. H. M. ARAÚJO⁵,
F. C. L. ALVARENGA⁶, M. D. LOPES⁶.**

RESUMO

Nosso objetivo foi avaliar os efeitos do benzoato de estradiol⁷ sobre a taxa de recuperação oocitária e embrionária e sua influência sobre o sistema hematopoiético. Vinte e quatro fêmeas foram utilizadas: GRUPO I – 12 cadelas que receberam uma única aplicação de benzoato de estradiol, dose de 0,2 mg/Kg, via intramuscular, entre o 2º e 7º dia do último acasalamento ou inseminação. GRUPO II - 12 cadelas que receberam solução oleosa diluente, dose de 0,2 ml/Kg em datas correspondentes. As cadelas foram submetidas a ovariosterectomia e as tubas uterinas e útero lavados, com solução de PBS, álcool polivinil e heparina. Os oócitos e embriões foram quantificados e classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento. O hemograma foi realizado em M1 (antes da aplicação do fármaco), M2 (15 dias após a aplicação do fármaco) e M3 (40 dias após a aplicação do fármaco). Para as variáveis recuperação de estruturas foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson e teste exato de Fisher na análise de viabilidade embrionária, análise de variância – ANOVA para medidas repetidas e o teste de Tukey para os parâmetros hematológicos. Todos os testes foram realizados a 5% de significância. A taxa de recuperação de estruturas no grupo I foi menor (22,88%) quando comparada ao grupo II (65,85%). Foi observada uma menor recuperação embrionária (proporção 3: 52) e um maior número de estruturas degeneradas (proporção 11: 1), no grupo I. Os parâmetros hematológicos mostraram diferença significativa em relação a concentração de hemáceas, hemoglobina, e volume globular, 15 dias após a aplicação do fármaco e diferença na concentração de leucócitos 40 dias após o uso dessa medicação em cadelas do grupo I, no entanto, ao final do experimento todas as fêmeas apresentavam hemogramas considerados normais.

PALAVRAS-CHAVE: Benzoato de estradiol. Cadelas. Contraceção

SUMMARY

We investigated the estradiol benzoate effects on oocytes/embryos recovery rate and the influence of this drug on the hematopoietic system. Twenty four bitches were used: Group I- 12 females that received a single application of estradiol benzoate, 0.2 mg / kg intramuscularly, between 2 and 7 days after the date of the last mismating or insemination. Group II- 12 bitches that received an oily diluent, dose of 0.2 ml / kg in corresponding dates. The bitches were ovariohysterectomized and the uterus / oviduct were isolated and flushed with a PBS, heparin and polyvinyl alcohol solution. Oocytes and embryos were quantified and classified according to their stage of development. Blood counts were performed on M1 (before the drug application), M2 (15 days after the drug application) and M3 (40 days after the drug application). Pearson correlation coefficient was used to analyze the variable retrieval structures, while Fisher exact test was used for the analysis of embryonic viability. ANOVA was used to analyze repeated measurements and Tukey test for hematological parameters. All tests were performed at 5% significance level. The recovery rate of total structures in group I was lower (22.88%) compared to group II (65.85%). A lower embryo recovery (ratio 3: 52) and a greater number of degenerated structures (ratio 11: 1) in group I. Hematological parameters showed significant difference in erythrocytes, hematocrit and hemoglobin concentrations 15 days after drug application and difference on leukocytes concentration 40 days after using this medication only in females in group I, however, at the end of the experiment all females had blood counts considered normal.

KEY-WORDS: Estradiol benzoate. Bitch. Contraception

¹Apoio Financeiro FAPESP- Processo 06/54612-3

²Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Botucatu, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, São Paulo, Brasil. * Autor para correspondência: ana_pagnano@yahoo.com.br

³Médica Veterinária, Doutora em Reprodução Animal

⁴Centro de Ciências Biológicas e da Natureza da Universidade Federal do Acre- UFAC, CEP 69915-900, Rio Branco, Acre, Brasil

⁵Médico Veterinário, Doutor em Reprodução Animal

⁶Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Botucatu, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, São Paulo, Brasil.

⁷Estrogin- Laboratório Farmavet

INTRODUÇÃO

Acasalamentos indesejáveis sempre fizeram parte das preocupações de proprietários de cães e gatos, no entanto, quando o assunto é contracepção, em especial o uso de anticoncepcionais, há conflito e discordância sobre o uso desses fármacos. O mecanismo de ação dos medicamentos destinados à prevenção, interrupção da gestação e/ou abortamento na cadela, depende do estágio do ciclo estral, da fase gestacional em que são utilizadas, da capacidade de gerar a morte fetal, da absorção e/ou abortamento ou até mesmo da indução do parto (HOFFMAN, 1999).

A utilização do benzoato de estradiol na prevenção da implantação em cadela recém-acasalada é uma forma de contracepção, que pode ser utilizada em projetos que visem o controle populacional dos cães, de forma menos dispendiosa. Estudos sobre a dose, efeitos colaterais, momento adequado do ciclo estral do animal, poderiam intensificar o uso desse hormônio e aumentar sua eficácia.

Os ésteres estrogênicos especialmente o benzoato de estradiol tem sido usado para interromper gestações indesejadas em cadelas durante muitos anos. Os estrógenos alteram o tempo de trânsito do zigoto nas tubas uterinas, modificam a bioquímica uterina e causam degeneração embrionária devido a seu efeito embriotóxico. Os estrógenos pode estimular as contrações uterinas e abertura cervical (BRUNCKHORST et al, 2000; FONTBONNE, 2010).

Publicações mais recentes têm demonstrado que o uso de estrógenos, em baixas doses, em cadelas recém-acasaladas, é seguro e efetivo (TSUTSUI, 2006). Esses estudos estão sendo realizados na tentativa de resgatar a popularidade do estrógeno exógeno como método de abortamento; esse fármaco foi por muitos anos considerado ineficiente e causador de efeitos colaterais sérios e graves para as cadelas provocando supressão de medula óssea com subsequente anemia aplástica.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do benzoato de estradiol na taxa de recuperação oocitária e/ou embrionária, na viabilidade das estruturas recuperadas, e verificar a influência desse fármaco no hemograma de cadelas recém-acasaladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e quatro fêmeas, sem raça definida, porte médio, com idades entre um e oito anos e histórico de acasalamento recente ou em fase folicular inicial, foram selecionadas para exame clínico geral completo, citologia vaginal e dosagens de progesterona sérica. A contagem de 80% de células superficiais no exame citológico foi utilizada como critério para a confirmação da fase estrogênica do ciclo. A progesterona sérica foi avaliada por RIA (SRIKANDAKUMAR et al, 1986) e todas as fêmeas incluídas na pesquisa apresentaram valores de progesterona entre 0,52 a 33 ng/ml e 80 a 100 % de células superficiais. Esses parâmetros foram utilizados, respectivamente, como critério para determinação da

onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH) e para determinação da fase do ciclo estral.

Foram utilizadas tanto fêmeas com histórico de coberturas recentes (entre 2 a 7 dias) não desejada pelo proprietário, como também fêmeas atendidas ainda na fase folicular do ciclo, as quais foram inseminadas artificialmente (I.A) com sêmen fresco de um cão doador treinado através de coleta manual e rotineiramente usado em outros experimentos. O protocolo de I.A utilizado foi: duas I.A, com intervalo de 48 horas, nos dias D4 e D6 da onda pré-ovulatória de LH, determinada segundo Feldman e Nelson (1996). A dose inseminante foi aproximadamente de 330 x 10⁶ espermatozoides móveis.

Essas fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos, GRUPO I – 12 cadelas que receberam uma única aplicação de benzoato de estradiol, dose de 0,2 mg/Kg, via intramuscular, entre o 2º e 7º dia da data do último acasalamento ou inseminação (TSUTSUI et al. 2006) e GRUPO II - 12 cadelas que receberam solução oleosa diluente, dose de 0,2 ml/Kg em datas correspondentes, sendo este último considerado o grupo controle

A ovariectomia (OHE) convencional foi realizada em todos os animais, entre os dias 15 a 18 da onda pré-ovulatória de LH, determinada pela dosagem de progesterona sérica. As tubas uterinas e o útero foram isolados e os cornos uterinos foram divididos em esquerdo e direito e seccionados em sentido longitudinal, em placas de Petri. As tubas uterinas e o útero foram lavados cuidadosamente para a recuperação de complexo *cúmulus oophorus* (CCOs) e/ou embriões em uma solução de PBS, acrescida de álcool polivinil e heparina, à temperatura de 30°C.

Os CCOs e os embriões colhidos foram transferidos para placas de Petri, sendo observados em lupa estereomicroscópica (Leica MZ 12,5) para a contagem e avaliação morfológica das estruturas. As estruturas recuperados foram classificadas em: oócito, mórula, blastocisto inicial, blastocisto expandido ou blastocisto eclodido, seguindo a classificação preconizada por Stringfellow & Seidel (1998).

A viabilidade embrionária foi realizada por meio da avaliação da integridade da cromatina nuclear através da coloração com iodeto de propídio e Hoechst 33342 e examinados através do uso de microscópio invertido equipado com luz fluorescente (filtro azul 535 e 617 nm). As estruturas embrionárias que fluoresceram em azul foram consideradas viáveis com membrana plasmática íntegra, enquanto que aquelas que fluoresceram em vermelho ou rosa foram consideradas inviáveis. Embriões com menos de 50% de células vermelhas foram considerados viáveis, seguindo critérios de Watt et al. (2009).

Para a análise hematológica, amostras sanguíneas foram colhidas para a realização de hemograma. Foram realizados hemogramas completos, utilizando método automatizado com estudo morfológico em esfregaços corados. Os valores de referência foram os mesmos adotados por Meinkoth & Clinkenberard (2000).

A ocorrência de alterações hematológicas foi avaliada em três momentos: Momento 1 (M1) antes da

aplicação do fármaco, Momento 2 (M2), 15 dias após a aplicação do fármaco e Momento 3 (M3), 40 dias após a aplicação do fármaco.

A análise estatística para as variáveis recuperação oocitária e embrionária utilizou o coeficiente de correlação de Pearson. Na análise de viabilidade embrionária foi utilizado o teste exato de Fisher. Para avaliação dos hemogramas foram realizadas análise de variância -ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey. Todos os testes foram realizados a 5% de nível de significância.

Os procedimentos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética e Biossegurança da Instituição em 21 de setembro de 2006.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das recuperações oocitária e embrionária encontram-se nas tabelas 1 e 2. O número de estruturas recuperadas no grupo I foi menor (22,88%) quando comparada a do grupo II (65,85%). Observou-se 13,6%

de recuperação embrionária e 9,4% de recuperação oocitária no grupo I e uma taxa de recuperação embrionária e oocitária de 96,2% e 1,2% respectivamente no grupo II, indicando o efeito do benzoato do estradiol no grupo I. No grupo I que recebeu o benzoato de estradiol foram recuperados apenas 03 embriões e 11 estruturas degeneradas enquanto que no grupo controle foram recuperados 52 embriões. Um dos efeitos do benzoato de estradiol é causar degeneração embrionária devido a seu efeito embriotóxico (BRUNCKHORST et al, 2000).

Foi verificada ausência de oócitos e de embriões em 05 cadelas do grupo I a despeito da presença de corpos lúteos. Essas fêmeas foram acasaladas entre o dia 0 do ciclo estral (D0 - dia do surgimento da onda pré-ovulatória de LH) e 5º dia após. O benzoato de estradiol provavelmente foi responsável pela degeneração desses oócitos e dos embriões, pois cerca de 95% das cadelas reprodutivamente normais que são acasaladas em seu período fértil tornam-se gestantes (REYNAUD et al. 2006).

Tabela 1- Número de corpos lúteos e estruturas recuperadas (oócitos, embriões e estruturas degeneradas) em tubas uterinas e útero de cadelas do grupo I (GI), após a aplicação de uma única aplicação de benzoato de estradiol,⁸ dose de 0,2 mg/Kg, via intramuscular, entre o 2º e 7º dia do último acasalamento.

Grupo I	Corpos lúteos	Número de estruturas recuperadas		
		Ovócitos	Embriões	Degenerados
E 01	-	0	0	0
E02	4	0	0	0
E03	8	8	0	0
E04	5	0	0	0
E05	9	0	0	2
E06	14	0	1 mórula	0
E07	6	0	0	0
E08	6	0	0	2
E09	9	0	1 blastocisto eclodido	0
E10	5	0	1 mórula	0
E011	13	0	0	7
E13	6	0	0	0
Total	85	8	3	11
Total	85		22	

⁸ Estrogin- Laboratório Farmavet

Tabela 2 - Número de corpos lúteos e estruturas recuperadas (oócitos, embriões e estruturas degeneradas) em tubas uterinas e útero de cadelas do grupo II (GII).

* fêmea em que a contagem de corpos lúteos não foi realizada

Grupo II	Corpos lúteos	Número de estruturas recuperadas		
		Ovócitos	Embriões	Degenerados
C01	-	0	3 blastocistos eclodidos	0
C02	9	1	0	0
C03	9	0	3 blastocistos eclodidos	0
C04	6	0	6 blastocistos eclodidos	0
C05	9	0	2 blastocistos eclodidos	0
C06	11	0	8 blastocistos eclodidos	0
C07	8	0	6 blastocistos expandidos	0
C08*	-	0	8 blastocistos expandidos	0
C09	9	0	7 blastocistos eclodidos	0
C11	9	0	6 blastocistos iniciais	0
C12	3	0	1 mórula	0
C13	9	0	2 blastocistos expandidos	1
Total	82	1	52	1
Total	82		54	

Tabela 3 - Análise da viabilidade embrionária observada em lavados uterinos de cadelas no grupo I e grupo II.

	Viabilidade embrionária			
	Embriões coletados	Estruturas analisadas	Viáveis	Não viáveis
Grupo I	3	3	2 (75%)	1 (25%)
Grupo II	52	23	16 (69,56)	7 (30,43)

A alteração da motilidade gametogênica e embrionária, induzindo a degeneração oocitária e embrionária pode ocorrer devido ao uso do benzoato de estradiol. O mecanismo de ação dos estrógenos exógenos está relacionada à alteração do microambiente tubárico, o que retarda o transporte gametogênico e embrionário o que promove o fechamento da junção útero-tubárica, com consequente retenção dos embriões e oócitos nas tubas uterinas, seguido do processo de degeneração dos mesmos (BRUNCKHORST et al, 2000; FONTBONNE, 2010).

A baixa taxa de recuperação vista no grupo I também pode ser consequência de um aumento da contratilidade tubárica e uterina estimulada pelo

benzoato de estradiol. O tratamento com estradiol em mulheres aumenta os níveis circulantes de ocitocina, (AMICO et al. 1981; MITCHELL et al. 1998). Essa situação também ocorre em cães e explicaria o aumento da contratilidade uterina e tubárica podendo levar a ausência de oócitos e embriões nestas fêmeas (FONTBONNE, 2010)

A despeito da baixa recuperação de oócitos e embriões no grupo I, essas estruturas quando recuperadas apresentavam-se viáveis (grupo I – 75% e grupo II- 69,56%), conforme pode ser observado na tabela 3. A porcentagem de estruturas viáveis foram semelhantes nos dois grupos.

O benzoato de estradiol é considerado um fármaco de curta duração e possui um período de meia vida de 3

Tabela 4 - Valores da média e desvio padrão referentes a hemáceas (HE), hemoglobina (HG), volume globular (VG), plaquetas (PL) e leucócitos (LC) do grupo I nos três momentos estudados **M1** (antes da aplicação da droga), **M2** (15 dias após a aplicação da droga) e **M3** (40 dias após a aplicação da droga) e valores de referência adotados por Meinkoth e Clinkenberard (2000).

M	HE (5,5 a 8,5 (X 10 ⁶ µL)	HG (12 a 18 (g/dl)	VG (%) (37 a 55%)	PL (180.000 µL)	LC (6- 17 (x 10 ³ / µL)
1	6627500 ± 172614,15 ^a	15,54 ± 0,56 ^a	45,08 ± 1,46 ^a	272614,58 ± 48600,58	13879,17 ± 804,52 ^a
2	6010833,33 ± 257806,77 ^b	13,59 ± 0,43 ^b	40,33 ± 1,65 ^b	226843,75 ± 55396,78	13658,33 ± 1467,55 ^{ab}
3	6111666,67 ± 184935,83 ^b	14,26 ± 0,41 ^b	43,17 ± 1,11 ^{ab}	236325 ± 33229,73	10394,91 ± 740,33 ^b
p	0,015	0,001	0,012	0,324	0,031

Letras distintas (a, b) demonstram diferença estatística na mesma coluna (p<0,05).

dias. Esta característica é benéfica, pois o tempo de ligação do medicamento com seus receptores é relativamente curto, o que gera efeitos colaterais menos severos (COWEN et al. 1985), quando comparado a outros compostos estrogênicos.

Na análise dos parâmetros hematológicos (tabela 4), foi observado diferença significativa (considerado p<0,05) para as variáveis hemáceas (p= 0,015), hemoglobina (p= 0,001) e volume globular (p= 0,012), 15 dias após a aplicação do fármaco (M2), sem ultrapassar, entretanto, os limites normais da espécie em todas as fêmeas que receberam o fármaco. Esse fato foi considerado como efeito do benzoato de estradiol, sem entretanto, excluir a possibilidade da ocorrência de coagulopatias

As alterações desses parâmetros observadas podem também ser atribuídas a perdas sanguíneas decorrentes do procedimento cirúrgico, já que em M2, quatro fêmeas já tinham sido submetidas a OHE

Em M3, os valores de leucócitos apresentaram-se diferentes estatisticamente em relação aos valores de M1 (p= 0,031), no entanto, não sendo caracterizado um estado de leucopenia. No geral, todas as fêmeas apresentaram hemograma dentro dos limites normais para a espécie, o que confirma os achados de Weiss & Klausner (1990) que identificaram efeito rápido e transitório dos estrógenos sobre a linhagem sanguínea.

Outra condição importante que deve ser considerada com o uso do benzoato de estradiol é a sensibilidade individual e a severidade dos efeitos colaterais em apresentar forte relação com a dose utilizada. Nenhum outro sintoma relacionado ao trato reprodutivo foi identificado nos animais estudados, embora o período de avaliação tenha sido relativamente curto para diagnosticar alterações uterinas e ou mamas.

CONCLUSÃO

As recuperações oocitárias e embrionárias foram menores nas fêmeas que receberam o benzoato de estradiol (0,2 mg/Kg por via intramuscular), o que confirma o efeito contraceptivo do fármaco quando utilizada entre o 2º e 7º dia da data do último acasalamento e não foram observadas alterações no perfil hematológico das fêmeas estudadas com relação aos parâmetros de normalidade até 40 dias após a aplicação do fármaco.

REFERÊNCIAS

- AMICO, J. A.; SEIF, S. M.; ROBINSON, A. G. Oxytocin in human plasma: correlation with neurophysin and stimulation with estrogen. **Journal Clinical Endocrinology Metabolic**, v.52, p. 988-993, 1981.
- BRUNCKHORS, C. S.; VUONO, L.; BARNABÉ, R. C. Interrupção eletiva da gestação em cães (*canis familiares*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.37, p.1-3, 2000.
- COWEN, R. A.; OLSON, P. N.; BEHRENDT, M. D.; WHEELER, S. L.; HUSTED, P. W.; NETT, T. M. Efficacy and toxicity of estrogen commonly used to terminate canine pregnancy. **Journal American Veterinary Association**, v.186, p.783-787, 1985.
- FONTEBONNE, A. **Clinical approach to unwanted mating and pregnancy termination**. In: Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology, 2º

ed. BSAVA: England, G, Von Heimendahl, A, 2010, p.106-120.

HOFFMAN, B. Hormonal control of pregnancy and parturition in the dog. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.219-226, 1999.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. **The canine estrus cycle. - section1: the bitch**. In: Canine and feline theriogenology. Saunders: Johnston, S. D.; Kustritz, M.V.; Olson, P, 2001, p.16-31.

MEINKOTH, J. M.; CLINKENBERARD, K. **Normal hematology of the dog**. In: Schalm's Veterinary Hematology, Australia: Blackwell Publishing: Feldman, B.; Zinkl, J.; Jain, N, 2000, p.1057- 1063.

MITCHELL B. F.; FANG, X.; WONG, S. Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition. **Journal Reproduction Fertility**, v.3, p.113-122, 1998.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: review. **Theriogenology**, v.66, p.1685-1693, 2006.

SRIKANDAKUMAR, A.; INGRAHAM, R. H.; ELLSWORTH, M.; ARCHBALD, L. F.; LIAO, A.; GODKE, R. A. Comparison of a solid-phase, no-extraction radio-immunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch, and cow. **Theriogenology**, v.26, p.779-793, 1986.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento do embrião e códigos de qualidade. In: Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, São Paulo: Sociedade Brasileira de Transferência de embriões: Stringfellow, D.A.; Seidel, S.M., 1998. p.173- 176.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; ENDO, S.; HAYAMA, A.; KAWAKAMI, E. Intrauterine transfer of early canine embryos. **Theriogenology**, v.66, p.1703-1705, 2006.

WATT, Y. J.; GEBHARDT, J.; DASIG, J.; APPLING, J.; BEHR, B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. *Fertility Steril*, p.91, 2009.

WEISS, D. J.; KLAUSNER, J. S. Drug-associated aplastic anemia in dogs: eight cases (1984-1988). **Journal American Veterinary Medical Association**, v.196, p.472-475, 1990.