



Marcadores bioquímicos e morfológicos da qualidade oocitária em cadelas: papel das células do *cumulus* e espécies reativas de oxigênio

[Biochemical and morphological markers of oocyte quality in female dogs: the role of *cumulus* cells and reactive oxygen species]

Ana Luiza Sousa Rodrigues¹ , Irving Mitchell Laines Arcce¹ , Natanael Aguiar Braga Negreiros¹ ,
Vicente José Figueirêdo Freitas¹ , Dárcio Ítalo Alves Teixeira^{*1} 

¹ Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil 

*autor correspondente: darcio.teixeira@uece.br

Recebido: 4 de outubro de 2024. Aceito: 3 de abril de 2025. Publicado: 26 de março de 2026.

Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: A taxa de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caninos é considerada baixa, com menos de 20 % de retomada meiótica, sendo a qualidade oocitária um fator determinante. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade oocitária de cadelas saudáveis, utilizando a viabilidade das células do *cumulus* (CCs), a verificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e a morfometria dos oócitos. Doze cadelas, com idade média de 2,3 ($\pm$ 1,3) anos e com peso médio de 9,4 ($\pm$ 5,2) kg, foram submetidas à ovariossalpingohisterectomia (OSH) para coleta dos oócitos. Posteriormente, foram realizados a classificação morfológica e o teste de viabilidade com Azul Cresil Brilhante (ACB) do complexo *cumulus-oophorus* (CCOs). Os CCOs viáveis foram separados em grupos de acordo com sua classificação morfológica (GI, GII ou GIII). Foi utilizada a sonda H2DCFDA para a avaliação do nível de EROs intracelular e as sondas Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo para a avaliação das CCs viáveis e apoptóticas. Na morfometria, foram avaliados o diâmetro total do oócito, o diâmetro do citoplasma, a espessura da zona pelúcida, o raio e o perímetro. Foi utilizada a análise de variância para a análise dos dados. O grupo GI apresentou o maior percentual de oócitos viáveis, as maiores médias dos parâmetros morfométricos e o menor nível de EROS intracelular. Não houve diferença entre os grupos GI e GII em relação ao percentual de CCs viáveis. Em conclusão, torna-se necessário realizar maiores investigações para determinar os níveis de EROS aceitáveis para a seleção de oócitos que serão utilizados para MIV em cadelas.

Palavras-chave: seleção de oócitos; competência meiótica; avaliação oocitária; células do *cumulus*; maturação *in vitro*.

Abstract: The *in vitro* maturation (IVM) rate of canine oocytes is generally considered low, with less than 20 % achieving meiotic resumption, and oocyte quality being a determining factor. This study was performed to evaluate the oocyte quality of healthy bitches using *cumulus* cell (CC) viability, reactive oxygen species (ROS) analysis, and oocyte morphometry. Twelve bitches, with a mean age of 2.3 $\pm$ 1.3 years and mean weight of 9.4 $\pm$ 5.2 kg, underwent ovariossalpingohysterectomy for oocyte collection. Morphological classification and viability testing of the *cumulus-oophorus*

complex (COCs) with Brilliant Cresyl Blue were subsequently performed. Viable COCs were divided into groups according to their morphological classification (GI, GII or GIII). An H2DCFDA probe was used to evaluate ROS levels in the oocytes, while Hoechst 33342 and propidium iodide probes were used to assess viable and apoptotic CCs, respectively. For morphometry, the total oocyte diameter, cytoplasmic diameter, zona pellucida thickness, radius, and perimeter were measured. Data were analysed using analysis of variance. The GI group had the highest percentage of viable oocytes, the greatest mean values for morphometric parameters, and the lowest levels of intracellular ROS. No difference was observed between the GI and GII groups in terms of the percentage of viable CCs. In conclusion, further investigation is required to establish acceptable ROS levels for selecting oocytes intended for IVM in bitches.

Keywords: Oocyte selection; meiotic competence; oocyte evaluation; *cumulus* cells; in vitro maturation.

1. Introdução

No mundo, 38 espécies da família dos canídeos correm risco de extinção, com duas delas já consideradas extintas. Dentre estas, seis espécies são nativas e/ou encontradas no Brasil: a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) ⁽¹⁾, o cachorro-do-mato-de-orelhas-curtas (*Atelocynus microtis*) ⁽²⁾, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) ⁽³⁾, o graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) ⁽⁴⁾, o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) ⁽⁵⁾ e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) ⁽⁶⁾. As principais ameaças a essas espécies estão relacionadas à destruição de seu habitat e a outras atividades humanas, como caça, introdução de espécies domésticas, disseminação de doenças e atropelamentos, que têm efeitos negativos diretos e indiretos.

A utilização de técnicas de reprodução assistida (TRAs) é fundamental para programas de preservação de espécies. O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é o principal modelo experimental para a família dos canídeos. No entanto, as particularidades fisiológicas reprodutivas da espécie ainda são um obstáculo para os procedimentos de maturação *in vitro* (MIV) e subsequente fecundação *in vitro* (FIV), que são pontos cruciais das TRAs. Muitos autores relatam resultados pouco satisfatórios, com menos de 20 % de competência meiótica dos oócitos e, até em 2007, ainda não tinha sido registrada progênie nascida por meio de MIV e FIV em caninos ⁽⁷⁾. No entanto, vêm sendo alcançados avanços na técnica ao longo dos anos: em um trabalho realizado por Qin et al. ⁽⁸⁾, testando diferentes concentrações de progesterona (P4) na MIV de oócitos caninos, obteve-se uma taxa de maturação de 29,7 %, além do nascimento dos primeiros filhotes vivos de cães utilizando MIV e FIV.

A competência meiótica do oócito canino durante a MIV está relacionada com vários aspectos morfológicos do complexo *cumulus-oophorus* (CCOs). É preconizada a utilização de oócitos de boa qualidade que apresentem o citoplasma de coloração escura e de aspecto homogêneo, com diâmetro maior que 100 µm (excluindo a zona pelúcida) e rodeado por duas ou mais camadas de células do *cumulus* (CCs) ⁽⁹⁾. O teste com corante Azul Cresil Brilhante (ACB) também é uma ferramenta amplamente utilizada, que possibilita a seleção de oócitos que finalizaram sua fase de desenvolvimento e, dessa forma, são mais viáveis para o processo de MIV ⁽¹⁰⁾. No entanto, esses critérios não têm sido suficientes para a seleção de oócitos totalmente competentes para MIV, tornando necessárias maiores investigações sobre critérios de seleção de oócitos.

Uma vez que já são conhecidos a influência da taxa de apoptose das CCs na capacidade de desenvolvimentos dos oócitos ⁽¹¹⁾ e os efeitos deletérios de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular na qualidade do oócito, torna-se necessária a verificação dessas características específicas em cadelas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo de oócitos de diferentes Graus de qualidade de cadelas, levando em consideração sua classificação morfológica, morfometria, teste de ACB, taxa de viabilidade de CCs e nível de EROs intracelular.

2. Material e métodos

2.1 Aspectos éticos e animais utilizados no estudo

Os dados foram obtidos a partir dos procedimentos de ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva, realizados no Hospital Veterinário Prof. Sylvio Barbosa Cardoso (HVSBC), localizado em Fortaleza (CE), durante o período de maio a julho de 2024. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA – UECE) com o seguinte nº de protocolo: NUP 31032.003854/2024-80. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes de cuidados com animais. Foram coletados ovários de doze cadelas comprovadamente saudáveis por meio de exames clínicos e laboratoriais, de raças variadas, entre um e cinco anos de idade.

2.2 Coleta dos CCOs

Após o procedimento cirúrgico, os ovários foram transportados em tubos Falcon de 50 mL a 5 °C em uma solução tampão-fosfato (PBS). A coleta dos CCOs foi realizada por meio da técnica de *slicing*. Resumidamente, os ovários foram isolados da bursa ovariana e delicadamente fatiados em camadas de 1 a 2 mm de espessura, com o auxílio de uma pinça anatômica “dente de rato” 14 cm e lâmina de bisturi nº 22, sobre a superfície de uma placa de Petri, contendo meio PBS, de forma que os CCOs presentes no córtex ovariano fossem liberados. Por meio da visualização em uma lupa estereomicroscópica (Zeiss Stemi 305, Jena, Alemanha), os COCs foram coletados e transferidos para gotas de 200 µL de PBS para que fossem realizadas a contagem e a classificação.

2.3 Classificação dos CCOs

Primeiramente, os CCOs foram classificados morfolologicamente de acordo com a metodologia proposta por Hewitt & England ⁽¹²⁾. Essa avaliação foi realizada por uma só pessoa no intuito de evitar a variabilidade entre operadores. Resumidamente, os CCOs com o citoplasma homogêneo, fortemente pigmentado e completamente cercado por duas ou mais camadas de células da granulosa, foram classificados como Grau I (GI); os citoplasmas com pigmentação clara e com camadas incompletas de células da granulosa foram classificados como Grau II (GII); e os que apresentaram o citoplasma fracamente pigmentado, sem células do *cumulus* aderidas, sem formato definido, foram classificados como Grau III (GIII), sendo considerados degenerados. Após a classificação, os CCOs foram separados em grupos, de acordo com seu Grau de classificação (GI, GII e GIII), em gotas contendo 200 µl de PBS. Posteriormente, os COCs foram corados com 90 µl de Azul Cresil Brilhante (ACB) por um período de 60 minutos, nas condições de 38,5 °C de temperatura, atmosfera de 5 % de CO₂ e 100 % de umidade relativa do ar. Por fim, foram realizadas duas lavagens em gotas de PBS para facilitar a visualização e a seleção dos oócitos ACB+, ou seja, aqueles em que o citoplasma estava fortemente corado em azul, como é exemplificado na Figura 1.

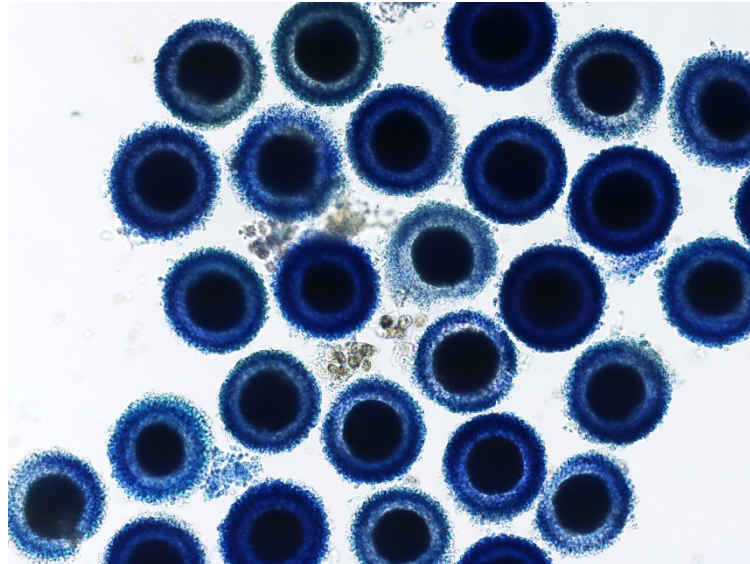


Figura 1. Oócitos caninos imaturos de Grau I, corados com o marcador Azul Cresil Brilhante (ACB), visualizados em lupa estereomicroscópica com magnitude de 50x. Nota-se que a maior parte dos CCOs possuem oócito de formato regular, zona pelúcida íntegra e três ou mais camadas de CCs. Os oócitos com o citoplasma homogêneo e fortemente corado de azul são considerados viáveis no teste de ACB.

2.4 Morfometria dos oócitos

Após a separação dos oócitos em gotas de acordo com seu Grau de classificação, foram capturadas imagens dos grupos de oócitos por meio de microscopia óptica (Nikon E400, Tóquio, Japão) com aumento de 40x. As medidas foram feitas utilizando o *software Image J*. Foram utilizados os parâmetros de diâmetro total (TD) (incluindo a zona pelúcida), diâmetro do oócito (OD) (excluindo a zona pelúcida) e espessura da zona pelúcida (ZP), com uma escala de μm (Figura 2). O raio (R) do oócito foi obtido por meio da divisão por dois do TD e o perímetro do oócito (OP) foi obtido utilizando o valor de R, com a equação $P = 2 \pi r$.

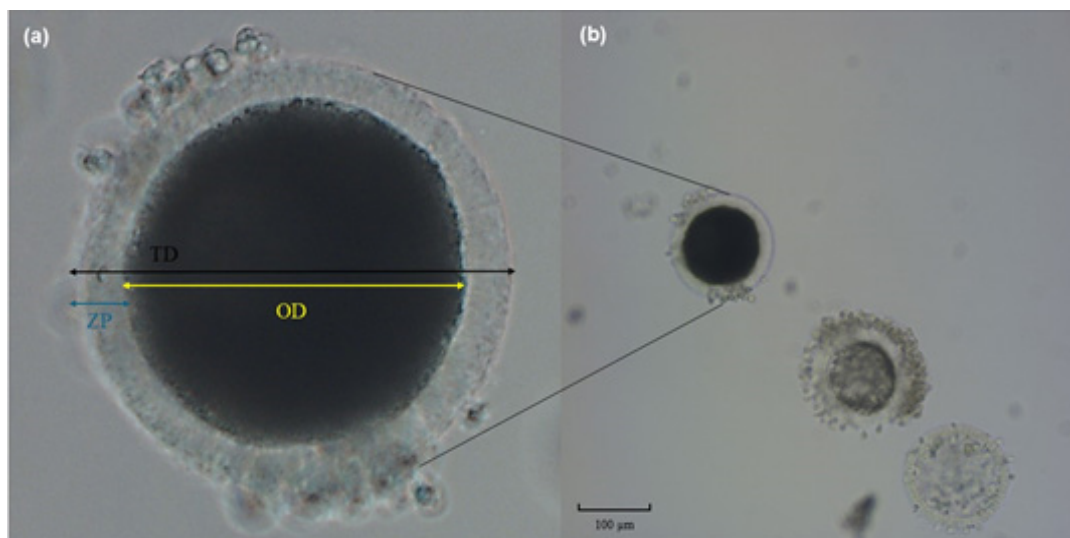


Figura 2. Oócito canino imaturo de Grau I, visualizado em microscopia óptica no aumento de 10x (b). Nas setas, estão demonstradas a forma de definição e de mensuração dos diâmetros utilizados para os parâmetros morfométricos (a). Diâmetro total (TD), diâmetro do oócito (CD) e espessura da zona pelúcida (ZP).

2.5 Estresse oxidativo e viabilidade das CCs

Os CCOs foram marcados utilizando a sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), conforme descrito anteriormente por Shi et al. ⁽¹³⁾, para avaliação do estresse oxidativo (Figura 3).

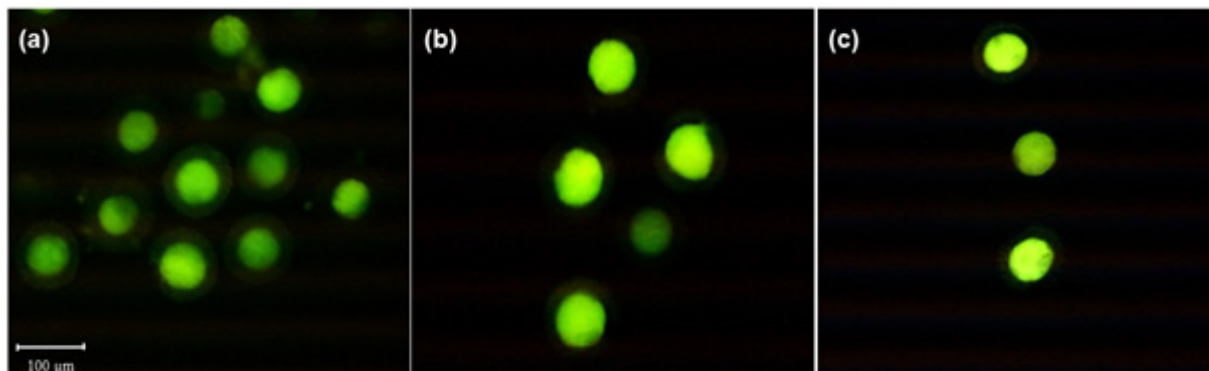


Figura 3. Oócitos caninos imaturos de Grau I (a), de Grau II (b) e de Grau III (c), visualizados por meio de microscopia de fluorescência no aumento de 10x, utilizando a sonda fluorescente H₂DCFDA e um marcador de nível EROs intracelular. A intensidade de fluorescência foi medida utilizando o *software Image J*. Quanto maior a intensidade, maior o nível de EROs.

Primeiramente, os CCOs passaram por processo de desnudamento, transferindo-os para gotas de PBS contendo hialuronidase (1 mg/mL TCM199) (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA) por 1 minuto; subsequentemente, as CCs foram removidas por meio de pipetagem suave, utilizando uma micropipeta automática. Para marcação, os oócitos foram incubados, utilizando 10 μM da sonda H₂DCFDA a 38,5 °C com 5 % de CO₂ por 20 minutos. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em gotas de 100 μl contendo PBS, transferidos para visualização em um microscópio de fluorescência (Nikon E400, Tóquio, Japão) e, então, foram obtidas imagens para posterior avaliação da intensidade de fluorescência. Foi utilizado um filtro de fluorescência com excitação de 497 nm e emissão de 518 nm. As CCs, obtidas após o processo de desnudamento, foram centrifugadas por 3 minutos a 600 g. Para facilitar a visualização, foram acrescentados 100 μl de TCM-Hepes e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, 10 μl da amostra foram adicionados a 20 μl de Hoechst 33342 (10 μg/ml; Sigma-Aldrich, Cidade, EUA), seguidos de 50 μl de Iodeto de Propídeo (1 μg/ml; Sigma-Aldrich, Cidade, EUA). A solução foi incubada por 10 minutos, protegida da luz e mantida a 37 °C. Posteriormente, uma alíquota foi colocada entre lâmina e lamínula e observada em um microscópio de fluorescência (Nikon E400, Tóquio, Japão), utilizando filtros de emissão de 617 nm para o iodeto de propídeo e de 430 nm para o Hoechst. Para a obtenção da taxa de viabilidade, 200 células foram avaliadas em cinco campos distintos e classificadas em células mortas coradas exclusivamente em vermelho ou viáveis coradas de azul (Figura 4), pois o Iodetoo de Propídeo não consegue atravessar a membrana de uma célula viável. Todas as imagens obtidas pela microscopia confocal foram avaliadas utilizando o *software Image J*.

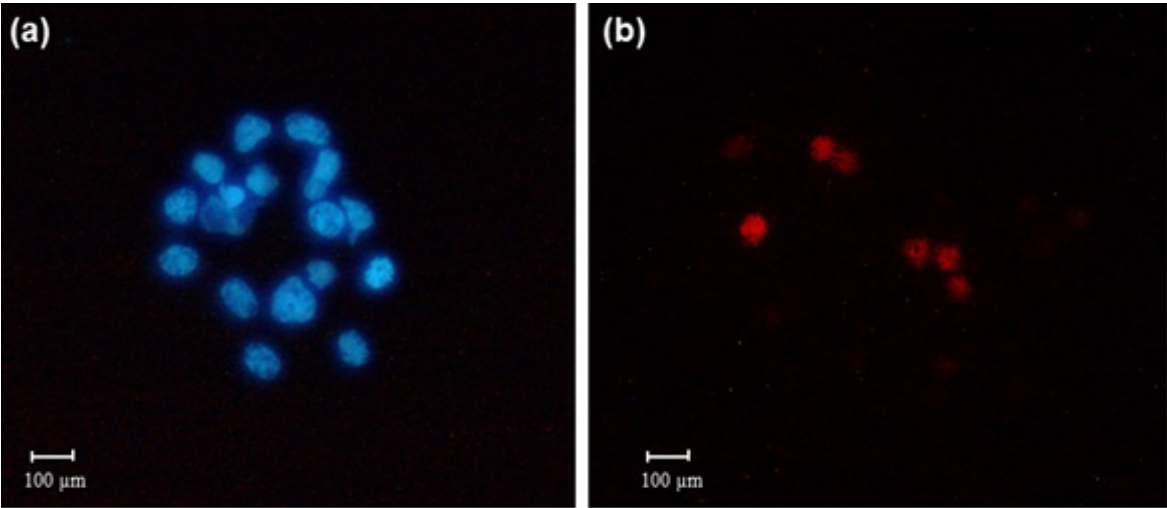


Figura 4. Imagens de células do *cumulus* de oócitos caninos de Grau I visualizados por meio de microscopia de fluorescência no aumento de 4x. As células foram incubadas com as sondas fluorescentes Hoechst 33342 (a) e Iodeto de Propídio (b). As células coradas em vermelho são aquelas marcadas pelo Iodeto de Propídio, e são consideradas apoptóticas.

2.6 Análise estatística

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa estatístico JMP ⁽¹⁴⁾. Primeiramente, para a confirmação da normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Confirmada essa condição, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey HSD. Os dados em percentuais foram analisados pelo uso do χ^2 .

3. Resultados

3.1 Classificação morfológica dos CCOs e viabilidade oocitária

Foram recuperados um total de 642 CCOs, dos quais 439 foram classificados como GI, 140 como GII e 61 como GIII. A distribuição entre oócitos ACB+ e ACB- está apresentada na Tabela 1. Assim, foi possível selecionar os CCOs que continham oócitos competentes para desenvolvimento. O grupo GI teve uma maior porcentagem de oócitos ACB+ (84,5 %), seguido pelo grupo GIII (72,12 %) e GII (63,57 %). O percentual de oócitos ACB- não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Tabela 1. Distribuição de oócitos caninos com diferentes Graus de qualidade (GI a GIII) e conforme a coloração de ACB.

Total de Oócitos		Graus de qualidade dos oócitos					
		GI		GII		GIII	
		N	%	N	%	N	%
ACB+	504	371	84,5 ^a	89	63,6 ^c	44	72,1 ^b
ACB-	138	68	15,5 ^a	51	36,4 ^a	17	27,9 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05).

3.2 Morfometria dos oócitos, viabilidade das células do *cumulus* (CCs) e nível intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A Tabela 2 demonstra que o grupo GI obteve as maiores médias das avaliações morfológicas, sobretudo com as variáveis de diâmetro total (TD), de raio (R) e de perímetro (OP), as quais mostraram diferenças estatísticas quando comparadas aos oócitos GII e GIII.

No que se refere à avaliação da viabilidade das CCs dos grupos GI e GII, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 2. Média ($\pm$ DP) dos parâmetros utilizados na morfometria de oócitos caninos, de acordo com sua classificação morfológica dos oócitos. Os parâmetros utilizados foram o diâmetro total (TD) (incluindo a zona pelúcida), diâmetro do oócito (OD) (excluindo a zona pelúcida), espessura da zona pelúcida (ZP), raio (R) do oócito e o perímetro do oócito (OP).

Classificação dos oócitos	Parâmetros morfométricos				
	TD	OD	R	ZP	OP
GI	120,78 $\pm$ 0,84 ^a	89,61 $\pm$ 4,12 ^a	60,35 $\pm$ 0,42 ^a	16,50 $\pm$ 2,31 ^a	378,98 $\pm$ 2,63 ^a
GI	108,9 $\pm$ 3,27 ^b	84,55 $\pm$ 4,52 ^a	54,45 $\pm$ 1,64 ^b	14,91 $\pm$ 1,51 ^a	341,95 $\pm$ 10,28 ^b
GIII	89,25 $\pm$ 6,77 ^c	63,54 $\pm$ 4,47 ^b	44,63 $\pm$ 3,38 ^c	12,12 $\pm$ 1,65 ^b	280,25 $\pm$ 21,25 ^c

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,001$).

Tabela 3. Média ($\pm$ DP) do número de células do *cumulus* marcadas com as sondas fluorescentes Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio nos grupos GI e GII, determinados de acordo com o Grau de classificação morfológica dos oócitos.

Classificação do oócito	Nº de células	
	HO	IP
GI	157,00 $\pm$ 9,17 ^a	43,00 $\pm$ 9,17 ^a
GI	145,67 $\pm$ 8,08 ^a	54,33 $\pm$ 8,08 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Por outro lado, os grupos apresentaram comportamentos diferentes quanto ao nível de EROs intracelular. Os oócitos GI apresentaram intensidade de fluorescência significativamente menor, seguidos pelos grupos GII e GIII, como pode ser observado na Tabela 4 e na Figura 5.

Tabela 4. Média ($\pm$ DP) do nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular demonstrado pela intensidade de fluorescência dos oócitos marcados com a sonda H₂DCFDA dos grupos GI, GII e GIII, determinados de acordo com o Grau de classificação morfológica dos oócitos.

Intensidade de fluorescência	Classificação do oócito		
	GI	GI	GIII
	62,09 $\pm$ 4,54 ^a	88,54 $\pm$ 4,51 ^b	110,95 $\pm$ 4,62 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,001$).

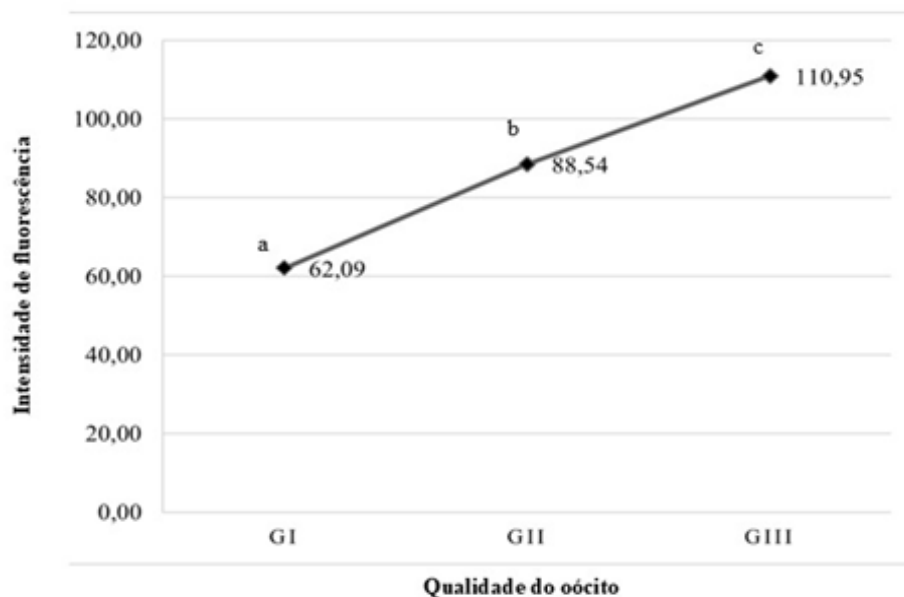


Figura 5. Gráfico de comparação da média da intensidade de fluorescência entre três grupos de oócitos caninos (GI, GII e GIII) corados com a sonda H_2DCFDA , um marcador de EROs intracelular. Letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença estatística entre os grupos, destacando-se o GIII como o grupo com maior nível de intensidade de fluorescência.

4. Discussão

O estudo atual teve por objetivo avaliar, de forma mais aprofundada, a qualidade oocitária na espécie canina por meio de análises de viabilidade das CCs, entre outras características de funcionalidade e de morfologia celular. Em conjunto com essas análises, foram realizadas a classificação morfológica dos CCOs, a viabilidade oocitária com ACB e a morfometria dos oócitos, as quais já são amplamente utilizadas na rotina de técnicas de reprodução *in vitro* na espécie, para que pudesse ser desenvolvido um estudo comparativo entre essas diferentes formas de avaliação da qualidade do oócito canino.

As CCs empregam um importante papel na retomada da meiose e, consequentemente, na maturação dos oócitos. O oócito e as CCs circundantes possuem uma íntima relação por meio de junções comunicantes (GJ) que permitem a troca de nutrientes, de íons e de pequenas moléculas reguladoras, sendo capazes de promover uma maturação nuclear e citoplasmáticas sincronizadas⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. Neste trabalho, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos GI e GII quanto ao percentual de CCs viáveis marcadas com Hoechst, um corante vital que marca o DNA de células viáveis. Lee et al.⁽¹⁷⁾, em um estudo comparativo entre CCO+ e -na espécie suína, demonstraram claramente que o grupo ACB+ apresentou, significativamente, menor nível de apoptose das CCs e maior taxa de maturação nuclear e, subsequentemente, desenvolvimento de embriões, considerando que oócitos de melhor qualidade têm a capacidade de reduzir a apoptose nas CCs. Em um estudo realizado na raposa-do-ártico (*Vulpes lagopus*), foi demonstrado que, sob condições de cultivo que preservava as GJs entre as células da *corona* e o oócito, uma população bastante pequena de CCs é capaz de impedir a retomada da meiose do oócito. Por outro lado, foi claramente observado que apenas os oócitos com duas ou mais camadas completas de CCs continuaram seu desenvolvimento em condição de cultivo e extrudaram o corpúsculo polar, enquanto os que continham apenas uma camada de CCs degeneraram-se⁽¹⁸⁾.

A avaliação da taxa de CCs viáveis, neste estudo, foi realizada apenas em CCOs ACB+, o que pode justificar os valores parecidos entre os grupos, porém a conformação das CCs é um fator fundamental para a maturação, o que atribui uma grande importância para a seleção dos oócitos de acordo com suas características morfológicas.

A produção de EROs é um processo natural do metabolismo celular. No entanto, o estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio do sistema redox da célula, com um aumento significativo do nível de EROs intracelular, que promove efeitos deletérios na célula⁽¹⁹⁾. Nas fêmeas mamíferas, a fecundidade diminui à medida que a idade cronológica aumenta, com uma queda no número de folículos e a piora na qualidade dos oócitos. Esses oócitos apresentam inúmeras alterações em sua biologia celular, entre elas alterações bioquímicas e moleculares, como o aumento da quantidade de EROs⁽²⁰⁾. A excessiva presença de EROs também está relacionada a doenças reprodutivas importantes em mulheres, como a endometriose e a síndrome do ovário policístico ⁽²¹⁻²²⁾. Em contrapartida, os EROs são fundamentais na mediação da foliculogênese, da meiose, da ovulação e do desenvolvimento embrionário como mensageiros secundários para sinalização celular, o que torna muito importante e delicado o equilíbrio do nível intracelular e extracelular dessas moléculas para a qualidade dos oócitos⁽²³⁾. No trabalho realizado por Silva et al. ⁽²⁴⁾, foi testado o efeito de diferentes níveis de tensão de oxigênio no meio de cultivo de maturação na viabilidade das CCs de oócitos caninos. A taxa de apoptose das CCs variou significativamente entre os grupos, com maiores taxas no grupo de tensão de oxigênio de 20 %, demonstrando que, nesse nível de tensão, o sistema redox dos oócitos foi excedido, causando efeitos deletérios aos CCOs.

Quando os oócitos são removidos do folículo e expostos a um ambiente artificial (por exemplo, meio de maturação), é esperado que ocorram mudanças associadas à ação dos compostos aos quais são submetidos. Além disso, a apoptose ocorre espontaneamente nos COCs submetidos a condições de cultivo subótimas ⁽²⁵⁻²⁷⁾. Os estudos já realizados relacionados ao nível de EROs envolvendo oócitos caninos avaliam, principalmente, a influência de diferentes meios de cultivo sobre o nível intracelular dessas moléculas e seus efeitos na qualidade do oócito. No presente estudo, foi realizada a avaliação do nível de EROs em oócitos submetidos às mesmas condições externas, levando-se em consideração o nível de EROs que pode ser encontrado em oócitos de diferentes Graus de qualidade, classificados de acordo com características morfológicas. Os oócitos de GI apresentaram menores valores de intensidade de fluorescência com uma média de 62,09 ($\pm$ 4,54). Esse tipo de resultado era esperado, uma vez que os oócitos classificadas como GI são considerados células de melhor qualidade. A avaliação teve como objetivo determinar se esta poderia ser uma ferramenta em potencial de seleção dos oócitos para maturação *in vitro*, uma vez que, normalmente, os ambientes *in vitro* aumentam a produção de EROs pela célula. Dessa forma, a seleção de células que naturalmente possuem menor nível de EROs intracelular antes da maturação *in vitro* poderia beneficiar os resultados. No entanto, é necessário realizar estudos mais amplos, realizando a maturação *in vitro* desses oócitos para determinar, com maior precisão, a competência meiótica dessas células, assim como determinar intervalos ótimos de EROs intracelulares de oócitos que serão utilizados para maturação *in vitro*.

A população de oócitos caninos, quando recuperados, possui uma composição bem heterogênea contendo oócitos competentes e não competentes, com origem de folículos em desenvolvimento ou atresícos. Portanto, é necessário que sejam empregados alguns critérios de seleção dos oócitos que serão utilizados para a MIV, de forma que esta seja a mais bem sucedida possível. Os critérios normalmente utilizados são de caráter morfológico, entre eles a morfologia

e o diâmetro do oócito e a conformação das CCs. Uma característica típica de oócitos totalmente desenvolvidos é a presença de um citoplasma de coloração escura e homogênea, resultado da presença fisiológica de altas concentrações de lipídeos⁽¹²⁾. O diâmetro do oócito (excluindo a zona pelúcida) é relacionado com o estágio do folículo no momento da coleta e com a aquisição de competência meiótica do oócito. De acordo com Hewitt e England ⁽²⁸⁾, quando os oócitos são separados em três grupos, levando em consideração os diâmetros >100 µm; 100 µm; < 100 µm, apenas os oócitos com diâmetros >100 µm atingiam os estágios de MII em maiores proporções do que os oócitos de diâmetros menores. Em estudos posteriores, foi possível concluir, de forma mais específica, que os oócitos com diâmetros >120 µm apresentaram melhor capacidade de chegar a MII do que os oócitos com diâmetro <110 µm ⁽²⁹⁻³⁰⁾. Nesse estudo, foi realizada a medida do diâmetro total do oócito (incluindo a zona pelúcida) e do diâmetro do oócito (excluindo a zona pelúcida) e outras medidas não realizadas convencionalmente, como o raio do oócito, a espessura da zona pelúcida e o perímetro do oócito. Os oócitos do grupo GI apresentaram as maiores médias de valores em todos os parâmetros, no entanto, comparado com os estudos realizados anteriormente, a média do diâmetro desses oócitos foi baixa ($89,61 \pm 4,12$) e, segundo esses mesmos estudos, a taxa de competência meiótica estaria entre 4-10 %. Apesar disso, em outros estudos, foram obtidos resultados semelhantes, com oócitos de Grau I apresentando diâmetros menores que 100µm. No trabalho realizado por Pereira et al. ⁽³¹⁾, foi feito o diâmetro de oócitos de Grau I, coletados em diferentes momentos do ciclo estral de cadelas, anestro e fase lútea. A média dos diâmetros foi de 77,62 µm e de 78,64 µm, não apresentando diferença significativa entre elas.

Para a avaliação da viabilidade durante a seleção de oócitos, ainda não existe um método confiável e não invasivo além da detecção da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). A G6PDH é uma enzima sintetizada por oócitos em processo de desenvolvimento, portanto os oócitos que possuem alta atividade dessa enzima ainda estão em processo de crescimento, enquanto aqueles que já terminaram seu processo de desenvolvimento têm atividade reduzida dessa enzima. Essa atividade pode ser observada por meio do teste de Azul Cresil Brilhante (ACB), tomando como base que a G6PDH, quando em alta atividade, tem a capacidade de tornar o corante azul incolor. Dessa forma, os oócitos que ficarem corados com coloração fortemente azul (ACB+) já terminaram seu processo de desenvolvimento ⁽³²⁾. Além disso, também foi observado, no estudo de Rodrigues et al. ⁽³³⁾, que a maior parte dos oócitos corados encontra-se em estágio de vesícula germinativa (GV), demonstrando que, na espécie canina, é esperado que os oócitos de Grau I previamente selecionados estejam nesse estágio. Outra característica que pode ser observada, por meio do ACB, é a sincronia da coloração do BCB entre o ooplasma e as células do *cumulus*. A diferença na coloração no COCs pode sugerir uma desconexão metabólica entre o oócito e suas células do *cumulus* com comprometimento da síntese de glutatona. No entanto, existe uma hipótese de que a assincronia do ACB é uma característica fisiológica dos COCs caninos⁽³⁴⁾. Para este trabalho, apenas oócitos ACB+ foram utilizados para as demais análises. Os resultados obtidos quanto à viabilidade dos oócitos demonstraram que os de Grau I (GI) tinham uma quantidade significativamente maior de oócitos ACB+ em relação aos demais grupos, com a taxa de 84,5 % de oócitos ACB+. Esse resultado está relacionado ao fato de essas mesmas células cumprirem todos os critérios de seleção em relação ao aspecto morfológico, com exceção do diâmetro oócito, que, em média, não ultrapassou os 100 µm. Apesar disso, ainda são as maiores células em relação aos outros grupos (GII e GIII), demonstrando que, em sua maioria, são células que completaram seu desenvolvimento.

5. Conclusão

Apesar de as CCs desempenharem um papel importante no desenvolvimento e na maturação do oócito, não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto à taxa de CCs viáveis. Adicionalmente, tornam-se necessárias maiores investigações para determinar os níveis de EROs aceitáveis para a seleção de oócitos que serão utilizados para MIV em cadelas.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

Contribuições do autor

Conceitualização: Teixeira, D. Í. A.; Análise formal: Freitas, V. J. F., Teixeira, D. Í. A.; Investigação: Rodrigues, A. L. S., Arcce, I. M. L.; Metodologia: Rodrigues, A. L. S., Arcce, I. M. L., Negreiros, N. A. B.; Recursos: Freitas, V. J. F.; Supervisão: Teixeira, D. Í. A.; Redação: Rodrigues, A. L. S., Teixeira, D. Í. A.

Declaração de uso de IA generativa

Os autores não utilizaram ferramentas ou tecnologias generativas de Inteligência Artificial na criação ou edição de qualquer parte deste manuscrito.

Referências

1. Lemos FG, Azevedo FC, Paula RC, Dalponte JC. *Lycalopex vetulus*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2020 [citado em 24 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T6926A87695615.en>
2. Leite-Pitman MRP, Williams RSR. *Atelocynus microtis*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2011 [citado em 24 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T6924A12814890.en>
3. Paula RC & DeMatteo K. *Chrysocyon brachyurus*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2015 [citado em 24 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en>
4. Lucherini M. *Lycalopex gymnocercus*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2016 [cited 2024 Aug 24]. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T6928A85371194.en>
5. DeMatteo K, Michalski F, Leite-Pitman MRP. *Speothos venaticus*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2011 [citado em 24 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T20468A9203243.en>
6. Lucherini, M. *Cerdocyon thous*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2015 [citado em 24 de agosto de 2024]. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4248A81266293.en>
7. Songsasen N, Wildt DE. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. *Anim. Reprod. Sci.* 2007;98, 2–22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.004>
8. Qin Y, Feng S, Zheng M, Liu X, Zhao J, Zhao Q, Ye J, Mi J, Zhong Y. Progesterone Promotes *In Vitro* Maturation of Domestic Dog Oocytes Leading to Successful Live Births. *Life*. 2022;12(11): 1778. <https://doi.org/10.3390/life12111778>
9. Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Factors involved in vivo and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology*. 2005;63(1), 41-59. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.004>
10. Van Soom A, Vandaele L, Goossens K, de Kruif A, Peelman L. Gamete origin in relation to early embryo development. *Theriogenology*. 2007;68, S131-S137. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.019>
11. Ruvo G, Bosco L, Pane A, Morici G, Cittadini E, Roccheri MC. Lower apoptosis rate in human *cumulus* cells after administration of recombinant luteinizing hormone to women undergoing ovarian stimulation for *in vitro* fertilization procedures. *Fertility and sterility*. 2007;87(3), 542-546. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.06.059>
12. Hewitt DA, England GC. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*. 1997;51, 83-91. PMID: 9404274.
13. Shi Y, Hu Y, Lv C, Tu G. Effects of Reactive Oxygen Species on Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Ann Transplant*. 2016 Nov 14;21:695-700. <https://doi.org/10.12659/aot.900463>

14. JMP Statistical Discovery LLC. <https://www.jmp.com/en/home>
15. Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 2001 Apr 1;55(6):1241-54. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00480-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00480-0)
16. Turathum B, Gao EM, Chian RC. The Function of *Cumulus* Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*. 2021 Sep 2;10(9):2292. <https://doi.org/10.3390/cells10092292>
17. Lee S, Kang HG, Jeong PS, Nanjidsuren T, Song BS, Jin YB, Lee SR, Kim SU, Sim BW. Effect of Oocyte Quality Assessed by Brilliant Cresyl Blue (BCB) Staining on *Cumulus* Cell Expansion and Sonic Hedgehog Signaling in Porcine during In Vitro Maturation. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 22;21(12):4423. <https://doi.org/10.3390/ijms21124423>
18. Srsen V, Kalous J, Nagyova E, Sutovsky P, King WA, Motlik J. Effects of follicle-stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on *cumulus* expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocytes in vitro. *Zygote*. 1998 Nov;6(4):299-309. <https://doi.org/10.1017/s0967199498000252>
19. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014 May 19;24(10):R453-62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
20. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*. 2009 Aug;30(5):465-93. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0006>
21. Augoulea A, Mastorakos G, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G, Creatsas G. The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility. *Gynecol Endocrinol*. 2009 Feb;25(2):75-81. <https://doi.org/10.1080/09513590802485012>
22. Costello MF, Shrestha SM, Sjoblom P, McNally G, Bennett MJ, Steigrad SJ, Hughes GJ. Power doppler ultrasound assessment of the relationship between age and ovarian perifollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2006 Sep-Oct;23(9-10):359-65. <https://doi.org/10.1007/s10815-006-9067-8>
23. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Jun 29;10:49. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>
24. Silva AE, Rodriguez P, Cavalcante LF, Rodrigues BA, Rodrigues JL. The influence of oxygen tension on *cumulus* cell viability of canine COCs matured in high-glucose medium. *Reprod Domest Anim*. 2009 Jul;44 Suppl 2:259-62. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01406.x>
25. Ikeda S, Imai H, Yamada M. Apoptosis in *cumulus* cells during in vitro maturation of bovine *cumulus*-enclosed oocytes. *Reproduction*. 2003 Mar;125(3):369-76. PMID: 12611600.
26. Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. *Obstet Gynecol*. 2005 Mar;105(3):653-60. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000152384.91385.71>
27. Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JL, Dewulf J, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ. Apoptosis in *cumulus* cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*. 2005 May;63(8):2147-63. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.054>
28. Hewitt DA, England GC. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim Reprod Sci*. 1998 Feb 27;50(1-2):123-39. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(97\)00083-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(97)00083-3). PMID: 9615185
29. Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. Oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*. 2000 Sep 1;54(4):535-42. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00368-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00368-x)
30. Otoi T, Ooka A, Murakami M, Karja NW, Suzuki T. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev*. 2001;13(2-3):151-5. <https://doi.org/10.1071/rd00098>
31. Pereira LMC, Bersano PRO, Lopes MD. Influência do Ciclo Estral no Diâmetro Oocitário em Cadelas. RVZ [Internet]. 27º de fevereiro de 2023 [cited 2024 Aug 27];21(3):462-70. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/1251>
32. Wu YG, Liu Y, Zhou P, Lan GC, Han D, Miao DQ, Tan JH. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res*. 2007 Aug;17(8):722-31. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.66>
33. Rodrigues BA, Rodriguez P, Silva AE, Cavalcante LF, Feltrin C, Rodrigues JL. Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue and obtained from bitches with low and high progesterone serum profiles. *Reprod Domest Anim*. 2009 Jul;44 Suppl 2:255-8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01408.x>
34. Rodrigues BA, Rodrigues JL. In vitro maturation of canine oocytes: a unique conundrum. *Animal Reproduction (AR)*[Internet]. 2010 [cited 2024 Aug 27];7(1), 3-15. Disponível em: <https://animal-reproduction.org/article/5b5a6063f7783717068b472b/pdf/animreprod-7-1-3.pdf>