

## Aperfeiçoando o ensaio de azul cresil brilhante como ferramenta para seleção de oócitos imaturos suínos

Maria Valéria de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Gabriela Pereira de Oliveira Lira<sup>2</sup>, Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira<sup>3</sup>, Alana Azevedo Borges<sup>4</sup>, Luiza Bento de Queiroz Neta<sup>5</sup>, Alexsandra Fernandes Pereira<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-4293-507X>

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-2724-4251>


<sup>3</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-7292-6908>

<sup>4</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-7118-261X>

<sup>5</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. <http://orcid.org/0000-0001-9267-6988>

<sup>6</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-2137-854X>

\*Autor para correspondência: Alexsandra Fernandes Pereira, e-mail: [alexsandra.pereira@ufersa.edu.br](mailto:alexsandra.pereira@ufersa.edu.br)

INFO ARTIGO	RESUMO
<p>Palavras-chaves: Ensaio colorimétrico; Qualidade oocitária; Refrigeração de ovários.</p> <p>Recived: 11/03/22 Accepted: 15/09/22 Published: 05/12/22</p> 	<p>O objetivo foi aperfeiçoar o ensaio de azul cresil brilhante (ACB) para seleção de oócitos imaturos suínos. Para tanto, as seguintes variáveis foram avaliadas: (I) o tempo de exposição ao ACB (15 vs. 40 vs. 60 vs. 90 min), (II) a concentração de ACB (15 vs. 20 vs. 26 µM), (III) o diluidor do ACB (NaCl vs. PBS vs. DPBS). Além disso, a última avaliação (IV) foi usar o ACB nas melhores condições estabelecidas para seleção de oócitos imaturos derivados de ovários refrigerados (24 h a 4°C) em diferentes meios (NaCl vs. PBS vs. DMEM). Assim, ovários foram colhidos em abatedouro e submetidos à aspiração folicular. Os oócitos recuperados foram quantificados e classificados de acordo com o objetivo de cada experimento, por critérios morfológicos e/ou ensaio de ACB. Os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher (<math>P &lt; 0,05</math>), considerando quatro repetições/experimento. No experimento I, os tempos de exposição de 40 e 60 min foram semelhantes a 90 min (<math>P &gt; 0,05</math>). No experimento II, nenhuma diferença foi observada no percentual de oócitos ACB+ entre as concentrações de 15 µM (56,0%), 20 µM (65,0%) e 26 µM (65,7%). No experimento III, não houve diferença entre os diluidores NaCl (82,1%) e PBS (82,3%); contudo, um menor percentual de oócitos de boa qualidade foi observado usando DPBS (70,3%). No quarto experimento, os meios NaCl e PBS apresentaram oócitos de melhor qualidade no ensaio de ACB. Em conclusão, o ensaio de ACB para oócitos imaturos suínos é eficiente usando o tempo de incubação superior a 40 min, concentrações entre 15 e 26 µM e diluidores NaCl e PBS. Adicionalmente, recomenda-se a associação da avaliação morfológica com o ensaio de ACB.</p>

### 1. Introdução

A suinocultura possui uma grande importância social e econômica para o Brasil, ocupando um lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio nacional. Tendo em vista esse mercado, faz-se necessário o desenvolvimento de biotecnologias que melhorem produção e capacidade reprodutiva dos suínos (Carmo et al., 2017). Nesse contexto, as biotécnicas reprodutivas são alternativas que possibilitam o melhoramento genético e o aumento da produtividade (Guimarães et al., 2017).

Assim, há a necessidade crescente em relação ao melhor aproveitamento dos gametas, especialmente os femininos, que são responsáveis pelo suporte fisiológico e molecular durante a fecundação e desenvolvimento embrionário inicial em mamíferos (Moussa et al., 2015; Carmo et al., 2017). Portanto, a obtenção de oócitos em quantidade, qualidade e viabilidade adequadas auxilia no sucesso final das técnicas *in vitro* (Deus et al., 2018), como a fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência nuclear de célula somática (TNCS).

Independente da espécie, os oócitos podem sofrer interferências que prejudicam sua qualidade, como o estágio reprodutivo da fêmea, tempo e temperatura de transporte ou armazenamento de ovários e métodos de recuperação oocitária (Santos et al., 2017; Deus et al., 2018). Por essa razão, esses gametas ainda imaturos devem ser selecionados para posterior maturação *in vitro* (MIV). Embora a seleção por avaliação morfológica seja amplamente utilizada para recuperação de oócitos de melhor qualidade, este método é considerado subjetivo e não prediz o real desenvolvimento desses gametas (Opiela e Kątska-książkiewicz, 2013). Assim, o ensaio não invasivo de azul cresil brilhante (ACB) tem sido utilizado para avaliar oócitos em diferentes espécies, tais como suínos (Yang et al., 2021), caprinos (Piras et al., 2019), ovinos (Fathi e Elkarmoty, 2021), bovinos (Barros et al., 2019) e equinos (Mlodawska et al., 2005).

O método de ACB tem a finalidade de selecionar oócitos mais competentes por meio da avaliação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que reduz o corante de azul para incolor (Rodríguez-González et al., 2003). Assim, nos oócitos em fase de crescimento (baixa qualidade), o ACB se torna incolor (ACB-) devido a elevada atividade de G6PDH; já nos oócitos crescidos (melhor qualidade) o ACB permanece azul (ACB+), pois a G6PDH apresenta baixa atividade (Fu et al., 2015). Em geral, oócitos ACB+ apresentam maior taxa de maturação, fecundação e formação de blastocisto (Wongsrikeao et al., 2005; Piras et al., 2019). Contudo, no que diz respeito à metodologia do ensaio de ACB, algumas questões ainda necessitam de mais estudos e aperfeiçoamentos para cada espécie, como o

tempo de incubação, concentração e meio de diluição do corante. Esses fatores variam entre protocolos e podem influenciar na eficiência do corante e na manutenção da qualidade oocitária durante o ensaio.

Assim o objetivo foi avaliar o tempo de exposição, a concentração e o diluidor do corante ACB visando aperfeiçoar esse ensaio e, posteriormente, aplicá-lo para a seleção de oócitos imaturos derivados de ovários suínos refrigerados em diferentes meios.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Comitê de ética e origem dos reagentes**

O presente trabalho foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA: 23091.001069/2015-79). Os seguintes reagentes: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) foram adquiridos da Impex (Rheine, Alemanha). O tampão fosfato modificado por Dulbecco (DPBS; D8662), o meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM; 3242) e o corante azul cresil brilhante (ACB, 5690713) foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

### **2.2. Desenho experimental**

A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas. Na primeira etapa foram realizados três experimentos para avaliar os seguintes parâmetros do ensaio de ACB: (I) tempo de exposição (15 vs. 40 vs. 60 vs. 90 min), (II) concentração (15 vs. 20 vs. 26 µM) e (III) diluidores [NaCl 0,9% vs. solução tampão fosfato (PBS) vs. DPBS] do ACB. A segunda etapa foi destinada a utilizar os melhores parâmetros de uso do ACB para a seleção de oócitos imaturos derivados de ovários refrigerados (24 h a 4°C) em diferentes meios (NaCl a 0,9% vs. PBS vs. DMEM) suplementados com 10% de soro fetal bovino.

### **2.3. Colheita de ovários e refrigeração**

Ovários suínos foram coletados em abatedouro local logo após o abate e transportados ao laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de antibiótico (penicilina 0,05 mg/mL), a 35-37 graus Celsius, em um período de 30 min. No laboratório, os ovários foram lavados e mantidos em nova solução de transporte para iniciar a colheita de oócitos.

Apenas na segunda etapa, os ovários recuperados foram refrigerados em tubos de 50 mililitros contendo aproximadamente 25 mililitros da solução de refrigeração de acordo com o desenho experimental. Os tubos foram mantidos em um refrigerador com termômetro para verificação da temperatura (4 graus Celsius). Após 24 h de armazenamento, os ovários foram aquecidos em banho-maria (37 graus Celsius) e submetidos à colheita oocitária. Ovários derivados dos grupos controle (não refrigerados) foram processados imediatamente.

### **2.4. Colheita oocitária**

Para obtenção dos oócitos imaturos, foi realizada aspiração folicular usando agulhas hipodérmicas de 21G acopladas a seringas descartáveis de 0,5 mililitros. Os folículos visíveis na superfície ovariana com 2 a 8 mm de diâmetro foram contados e os oócitos recuperados. Em seguida, o líquido folicular foi mantido em repouso durante 15 min para formação do precipitado contendo os oócitos, o qual foi colocado em placa de petri (100 x 20 mm) contendo 3,0 mililitros de PBS e visualizado sob estereomicroscópio.

### **2.5. Seleção oocitária**

Para a avaliação morfológica, os oócitos recuperados foram classificados de acordo com o número de camadas de células do cumulus (CCs) e homogeneidade do citoplasma. Oócitos apresentando uma ou mais camadas de CCs e citoplasma homogêneo foram considerados viáveis (qualidade boa) e oócitos parcialmente desnudos ou desnudos com citoplasma heterogêneo foram considerados não viáveis (qualidade ruim) (Deus et al., 2018). Já no ensaio de ACB, oócitos foram lavados duas vezes em gotas de 200 µL do diluidor e, em seguida, expostos a gotas contendo o corante a 38,5 graus Celsius, obedecendo cada experimento do desenho experimental. Após o tempo de exposição, as estruturas foram lavadas duas vezes com a solução de diluição do ACB e avaliadas sob estereomicroscópio. Os oócitos com coloração azul parcial e/ou total em seu citoplasma foram considerados ACB+ e de boa qualidade. Por outro lado, oócitos com citoplasma incolor foram considerados ACB- e de baixa qualidade.

## 2.6. Análise de dados e estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo teste exato de Fisher, usando o software Graphpad Instat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Tais resultados foram expressos como médias percentuais  $\pm$  erro padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Para cada experimento, foram realizadas quatro repetições, totalizando 16 repetições em toda a pesquisa.

## 3. Resultados e Discussão

No experimento 1 da primeira etapa foi avaliado o tempo de exposição ao corante ACB (15 vs. 40 vs. 60 vs. 90 min), onde observou-se que a incubação por 40 e 60 min foi tão eficiente quanto 90 min para a seleção de oócitos suínos de boa qualidade ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1). Contudo, a incubação das estruturas durante o período de apenas 15 min não foi eficiente ( $P < 0,05$ ). Provavelmente este tempo não é suficiente para a estabilização do ACB dentro do citoplasma dos oócitos, gerando uma redução no percentual de ACB+. Em geral, o tempo de incubação de oócitos imaturos com o ACB varia de 60 ou 90 min, sendo necessária uma padronização (Wongsrikeao et al., 2005; Santos et al., 2017).

**Tabela 1** – Avaliação oocitária após diferentes tempos de exposição ao corante azul cresil brilhante (ACB) para seleção de oócitos suínos imaturos.

Qualidade oocitária	15 min, % (n)	40 min, % (n)	60 min, % (n)	90 min, % (n)
ACB+	29,5 (39/132) <sup>b</sup>	73,8 (121/164) <sup>a</sup>	83,8 (140/167) <sup>a</sup>	76,8 (116/151) <sup>a</sup>
ACB-	70,5 (93/132) <sup>a</sup>	26,2 (43/164) <sup>b</sup>	16,2 (27/167) <sup>b</sup>	23,2 (35/151) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>: Letras distintas indicam diferença entre os tempos na mesma linha ( $P < 0,05$ ).

No presente trabalho, tanto 40 min quanto 60 min se mostraram suficientes para que a enzima G6PDH atue reduzindo ou não o corante ACB de azul para incolor. Esse resultado é bastante positivo, pois a redução desse tempo permite que os oócitos sejam submetidos a maturação *in vitro* mais rapidamente. Dessa forma, é possível obter melhores taxas de maturação nuclear, fecundação monospermica, desenvolvimento e qualidade embrionária, assim como já demonstrado em suínos (Wongsrikeao et al., 2005). Finalmente, devido o resultado positivo e o menor tempo de incubação, para o segundo experimento foi utilizado o tempo de 60 minutos.

Outro aspecto importante do ensaio de ACB é a sua concentração, a qual é de 26  $\mu$ M em muitos trabalhos (Wongsrikeao et al., 2005; Santos et al., 2017). Contudo, Wang et al. (2012) avaliaram o efeito de 26 e 52  $\mu$ M de ACB em oócitos ovinos e verificaram um efeito negativo da maior concentração na taxa de maturação oocitária (86,16% vs. 56,62%). Já em trabalhos com suínos, a concentração de 13  $\mu$ M de ACB por 90 min foi utilizada com resultados satisfatórios (Roca et al., 1998; Pawlak et al., 2011). Diante disso, observa-se a importância de estabelecer a concentração do ACB para a espécie suína. Por essa razão, no presente estudo, foram testadas concentrações menores que 26  $\mu$ M de ACB por 60 min para selecionar oócitos suínos (Tabela 2). Nenhuma diferença significativa foi observada no percentual de oócitos de boa qualidade (ACB+) entre as concentrações do corante. Portanto, quantidades de 15 a 26  $\mu$ M podem ser utilizadas em suínos mantendo a eficiência do método de seleção.

**Tabela 2** – Avaliação de diferentes concentrações e diluidores do corante azul cresil brilhante (ACB) na seleção de oócitos imaturos suínos.

Diferentes concentrações	15 $\mu$ M, % (n)	20 $\mu$ M, % (n)	26 $\mu$ M, % (n)
ACB+	56,0 (84/150)	65,0 (102/157)	109/166 (65,7)
ACB-	44,0 (66/150)	35,0 (55/157)	57/166 (34,3)
Diferentes diluidores	NaCl, % (n)	PBS, % (n)	DPBS, % (n)
ACB+	82,1 (101/123) <sup>a</sup>	82,3 (102/124) <sup>a</sup>	70,3 (83/118) <sup>b</sup>
ACB-	17,9 (22/123) <sup>b</sup>	17,7 (22/124) <sup>b</sup>	29,7 (35/118) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Letras distintas indicam diferença na mesma linha ( $P < 0,05$ ). NaCl a 0,9%: solução salina; PBS: solução tampão fosfato; DPBS: solução tampão fosfato modificada por Dulbecco.

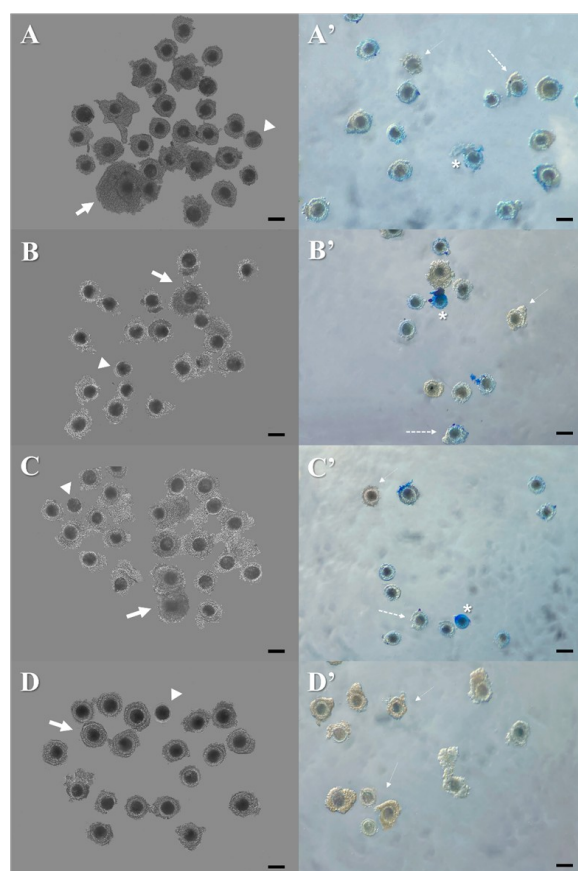
Com relação aos diferentes diluidores (NaCl, PBS e DPBS) do ACB testados neste estudo, existem diferenças quanto a composição de sais e nutrientes que podem influenciar na manutenção da viabilidade dos oócitos e atuação do corante. Nossos resultados não mostraram diferenças nos percentuais de oócitos de boa qualidade após a incubação (Tabela 2) com os meios NaCl e PBS, os quais são os menos complexos. Contudo, um menor percentual de estruturas ACB+ foi observado usando o DPBS. Isto pode ter sido ocasionado devido a maior complexidade desse meio, o qual pode ter influenciado de alguma forma a reação ou estabilidade do corante. Por outro lado, trabalhos anteriores já relataram a

utilização do DPBS como diluidor do ACB (Mirshamsi et al., 2013; Fakruzzaman et al., 2013). Diante disso, sugerimos a utilização do PBS durante a seleção oocitária com o ACB, pois este é um meio com mais constituintes comparado ao NaCl, que ainda assim não prejudicou o resultado da coloração. Em algumas situações, uma das limitações da produção *in vitro* de embriões é a condição de transporte dos ovários, especialmente quando os abatedouros ou animais doadores de oócitos estão em locais distantes dos laboratórios, necessitando de várias horas de transporte (Wang et al., 2011). Sabendo disso, para aplicar as melhores condições estabelecidas do ACB, foi analisada a influência do armazenamento refrigerado de ovários suínos em diferentes meios (NaCl a 0,9% vs. PBS vs. DMEM) sobre a qualidade oocitária avaliada por morfologia e ensaio de ACB (Figura 1, Tabela 3). Em termos quantitativos, uma maior taxa de recuperação oocitária foi observada no grupo NaCl, o qual também foi superior ao controle, que não diferiu dos demais meios. Esses dados podem ser diretamente afetados pelo manipulador e, portanto, não predizem a real influência da refrigeração sobre os ovários.

**Tabela 3** – Qualidade de oócitos suínos recuperados de ovários refrigerados em diferentes meios.

Grupo	Número de ovários	Taxa de recuperação (%)	Oócitos viáveis (%)	Oócitos ACB+ (%)
Controle	13	15,5 (31/200) <sup>b</sup>	61,3 (19/31)	67,7 (21/31) <sup>a</sup>
NaCl	12	23,7 (61/257) <sup>a</sup>	50,8 (31/61)	18,0 (11/61) <sup>b</sup>
PBS	13	15,1 (34/225) <sup>b</sup>	67,6 (23/34)	29,4 (10/34) <sup>b</sup>
DMEM	12	11,7 (26/222) <sup>b</sup>	69,2 (18/26)	0,0 (0/26) <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Letras distintas indicam diferença na mesma coluna ( $P < 0,05$ ). NaCl: solução salina a 0,9%; PBS: solução tampão fosfato; DMEM: meio essencial mínimo modificado por Dulbecco.



**Figura 1** – Avaliação de oócitos imaturos suínos derivados de ovários refrigerados (4°C) por 24 h em diferentes soluções de armazenamento. A e A': oócitos viáveis avaliados por morfologia e após o ensaio de ACB recuperados imediatamente após o

abate. B e B': oócitos viáveis avaliados por morfologia e após o ensaio de ACB recuperados de ovários refrigerados (4°C) em NaCl. C e C': oócitos viáveis avaliados por morfologia e após o ensaio de ACB recuperados de ovários refrigerados (4°C) em PBS. D e D': oócitos viáveis avaliados por morfologia e após o ensaio de ACB recuperados de ovários refrigerados (4°C) em DMEM. Setas grossas indicam oócitos viáveis por análise morfológica e triângulos indicam oócitos não viáveis por análise morfológica. Asteriscos indicam oócitos completamente marcados e ACB+, setas pontilhadas indicam oócitos parcialmente marcados e ACB+ e setas finas indicam oócitos ACB-. Barras de escala = 200  $\mu$ m. 10 $\times$ .

Quanto às avaliações qualitativas, utilizando a morfologia convencional, nenhuma diferença foi verificada entre os grupos controle e refrigerados em distintos meios. Entretanto, nos resultados do ensaio de ACB, a refrigeração reduziu a qualidade dos oócitos em todos os grupos refrigerados comparado ao controle. Contudo, ocorreu uma resposta similar entre os meios NaCl e PBS, os quais são mais simples, de fácil preparo e baixo custo. Por outro lado, o DMEM apresentou um resultado inferior ao NaCl e o PBS. Acredita-se que esse resultado se deve a composição mais rica do DMEM que pode torná-lo mais instável e propício a contaminação em condições externas a incubadora de CO<sub>2</sub>, como no caso da refrigeração. Em soma, é importante ressaltar a maior sensibilidade do ACB em identificar diferenças qualitativas nos oócitos em comparação à classificação morfológica. Portanto, é indicado o uso conjunto destes dois métodos de seleção oocitária em suínos visando aumentar o sucesso da produção *in vitro* de embriões.

#### 4. Conclusão

O ensaio de ACB pode ser utilizado para selecionar oócitos imaturos suínos com tempo de incubação superior a 40 min, em concentrações entre 15 e 26  $\mu$ M e utilizando como diluidores do corante meios simples como NaCl e PBS. Adicionalmente, estas soluções mais simples podem ser empregadas durante a refrigeração de ovários suínos, permitindo boa recuperação de oócitos de qualidade. Finalmente, aconselha-se o uso combinado da avaliação morfológica e do ensaio de ACB para a seleção de oócitos suínos mais competentes para o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

#### 5. Referências

- Barros FDA, Adona PR, Guemra S, et al. *In vitro* embryos production of oocytes selected based on follicular size and by brilliant cresyl blue staining. *Semin Cienc Agrar*, 40;(4):1523-1534, 2019. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n4p1523.
- Carmo IB, Oliveira PL, Oliveira YS, et al. Bem-estar em suínos: manejo no pré-abate: Revisão. *PUBVET*, 11;(10):0947-1073, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.22256/PUBVET.V11N10.966-969>.
- Deus ARS, Silva MB, Santos MVO, et al. Influência dos meios de estocagem durante o transporte de ovários bovinos a 4°C sobre a recuperação e qualidade oocitária. *ARS Vet*, 33;(2):44-50, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2017v33n2p44-50>.
- Fakruzzaman M, Bang JI, Lee KL, et al. Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte-derived embryos of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining. *Anim Reprod Sci*, 142;(1-2):19-27, 2013. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.08.012.
- Fathi M, Elkarmoty AF. Effect of adding growth factors during *in vitro* maturation on the developmental potentials of ewe oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *Vet World*, 14;(2):452, 2021. DOI: 10.14202/vetworld.2021.452-456.
- Fu B, Ren L, Liu D, et al. Subcellular characterization of porcine oocytes with different glucose-6-phosphate dehydrogenase activities. *Asian-australas J Anim Sci*, 28;(12):1703, 2015. DOI: 10.5713/ajas.15.0051.
- Guimarães DD, Amaral GF, Maia GBDS, et al. Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. *BNDES Setorial*, 45: 85-136, 2017.
- Mirshamsi SM, Karamishabankareh H, AHmadi-Hamedani M, et al. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci*, 136;(4):245-251, 2013. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.11.002.
- Mlodawska W, Pawlowska A, Kochan J. Meiotic competence of mare oocytes selected using the brilliant cresyl blue test. *Havemeyer Found Monogr Ser*, 18:21-24, 2006.
- Moussa M, Shu J, Zhang XH, et al. Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". *Anim Reprod Sci*, 155:11-27, 2015. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.01.011.
- Opiela J, Kątska-Książkiewicz L. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). *Reprod Biol*, 13;(3):177-183, 2013. DOI: 10.1016/j.repbio.2013.07.004.
- Pawlak P, Renska N, Pers-Kamczyc E, et al. The quality of porcine oocytes is affected by sexual maturity of the donor gilt. *Reprod Biol*, 11;(1):1-18, 2011. DOI: 10.1016/s1642-431x(12)60060-6.
- Piras AR, Menendez-Blanco I, Soto-Heras S, et al. Resveratrol supplementation during *in vitro* maturation improves embryo development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *J Reprod Dev*, 65;(2):113-120, 2019. DOI: 10.1262/jrd.2018-077.
- Roca J, Martinez E, Vazquez JM, et al. Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod Fertil Dev*, 10:479-485, 1998. DOI: 10.1071/rd98060.
- Rodríguez-González E, López-Bejar M, Izquierdo D, et al. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev*, 43;(2):179-187, 2003. DOI: 10.1051/rnd:2003012.

- Santos MVO, Queiroz Neta LB, Borges AA, et al. Influência do corpo lúteo sobre a recuperação de oócitos imaturos bovinos derivados de fêmeas post-mortem. *Holos*, 7;278-283, 2017. DOI: <https://doi.org/10.15628/holos.2017.5556>.
- Wang L, Lin J, Huang J, et al. Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *J Biomed Biotechnol*, 2012;1-7, 2012. DOI: 10.1155/2012/161372.
- Wang YS, Zhao X, Su JM. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, 124;(1-2);48-54, 2011. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2011.01.015.
- Wongsrikeao P, Otoi T, Karja NWK, et al. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. *J Reprod Dev*, 51;(1);87-97, 2005. DOI: 10.1262/jrd.51.87.
- Yang CX, Liu S, Miao JK. CoQ10 improves meiotic maturation of pig oocytes through enhancing mitochondrial function and suppressing oxidative stress. *Theriogenology*, 159;77-86, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.009>.