

Artigo original

Luiza Bento de Queiroz Neta¹
Maria Valéria de Oliveira Santos¹
Alana Azevedo Borges¹
Alexsandra Fernandes Pereira²

Otimização do ensaio de azul cresil brilhante visando à seleção qualitativa de oócitos bovinos derivados de ovários submetidos a diferentes temperaturas e tempos de transporte

Optimization of the brilliant cresyl blue assay aiming at the qualitative selection of bovine oocytes derived from ovaries submitted to different temperatures and transport times

ABSTRACT

The success of *in vitro* embryo production (IVEP) depends on the quality of immature oocytes, which are normally selected according to the oocyte morphology. Nevertheless, this method is subjective and alternatives have been proposed, such as the brilliant cresyl blue assay (BCB). Thus, the aim was to verify the incubation conditions of BCB for the time of exposure to the dye (15 vs. 40 vs. 60 vs. 90 min), concentration (15 vs. 20 vs. 26 μ M) and diluent (NaCl vs. PBS vs. DPBS). Additionally, this assay was used to evaluate the quality of oocytes retrieved from ovaries transported at different temperatures (25°C vs. 35°C) and times (2 h vs. 10 h). In all experiments, oocytes recovered by follicular aspiration were classified by morphological criteria and, then, incubated with the BCB according to the conditions to be evaluated. All data were analyzed by Fisher's exact test ($P < 0.05$), considering four replicates per experiment. Thus, the exposure time, concentration and diluent of BCB had the highest rates of viable oocytes were 60 min (64.9%) and 90 min (73.4%), 26 μ M (59.6%) and PBS (49.2%). In both assays the oocyte quality, no differences were observed in the rates of oocytes viable derived from ovaries transported at different temperatures. Although no difference was observed in the oocyte quality between ovarian transport times according to morphological criteria, the BCB test indicated a reduction in oocyte quality of ovaries transported for 10 h (51.2%), when compared to 2 h (69.6%, $P < 0.05$). Thus, for the BCB assay the incubation time of 60 min at the concentration of 26 μ M and with the PBS diluent for the selection of immature bovine oocytes was established. Moreover, were observed better results with ovaries transported at 35°C up to 2 h of transport.

RESUMO

O sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE) depende da qualidade de oócitos imaturos, os quais são normalmente selecionados de acordo com a morfologia oocitária. Contudo, esse método é subjetivo e alternativas vem sendo propostas, como o ensaio de azul cresil brilhante (Brilliant Cresyl Blue – BCB). Assim, o objetivo foi verificar as condições de incubação do BCB, quanto ao tempo de exposição ao corante (15 vs. 40 vs. 60 vs. 90 min), concentração (15 vs. 20 vs. 26 μ M) e diluidor (NaCl vs. PBS vs. DPBS). Adicionalmente, esse ensaio foi empregado para avaliar a qualidade de oócitos colhidos de ovários transportados em diferentes temperaturas (25°C vs. 35°C) e tempos (2 h vs. 10 h). Em todos os experimentos, oócitos recuperados por aspiração folicular foram classificados por critérios morfológicos e, em seguida, incubados com o BCB de acordo com as condições a serem avaliadas. Todos os dados foram analisados pelo teste exato de Fisher ($P < 0,05$), considerando quatro repetições por experimento. Assim, o tempo de exposição, a concentração e o diluidor do BCB que apresentaram as maiores taxas de oócitos viáveis foram 60 min (64,9%) e 90 min (73,4%), 26 μ M (59,6%) e PBS (49,2%). Em ambos os ensaios de qualidade oocitária, nenhuma diferença foi observada nas taxas de oócitos viáveis oriundos de ovários transportados em diferentes temperaturas. Embora nenhuma diferença tenha sido observada na qualidade oocitária entre os tempos de transportes de ovários de acordo com os critérios morfológicos, o ensaio de BCB indicou uma redução dessa qualidade de oócitos de ovários transportados por 10 h (51,2%), quando comparado a 2 h (69,6%, $P < 0,05$). Assim, para o ensaio de BCB, foi estabelecido o tempo de incubação de 60 min, na concentração de 26 μ M e com o diluidor PBS para a seleção de oócitos bovinos imaturos. Além disso, foram observados melhores resultados com ovários transportados a 35°C até 2 h de transporte.

KEYWORDS

Cattle; Oocyte classification; *In vitro* fertilization.

PALAVRAS-CHAVE

Bovinos; Classificação oocitária; Fertilização *in vitro*.

AUTOR CORRESPONDENTE:

Alexsandra Fernandes Pereira
<alexandra.pereira@ufersa.edu.br >
Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA),
Universidade Federal Rural do Semi-Árido
(UFERSA), Av. Francisco Mota, 572, CEP 59625-
900, Mossoró – RN – Brasil.

¹. Universidade Federal Rural do Semi-Árido

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos consiste numa biotécnica reprodutiva de grande importância para os setores científicos, produtivos e comerciais de obtenção de embriões, sendo o Brasil, em nível internacional, o maior produtor de embriões por fecundação *in vitro* (LUSTOSA et al., 2017). Nesse contexto, estratégias que visem à otimização desta biotécnica tornam-se essenciais para aumentar sua eficiência global.

Em geral, a avaliação da qualidade de oócitos imaturos consiste na primeira etapa da PIVE, uma vez que diferentes fatores podem afetar essa qualidade, como os aspectos reprodutivos da fêmea (SANTOS et al., 2017a), tempo e temperatura de transporte dos ovários (DEUS et al., 2018), e métodos de recuperação oocitária (SANTOS et al., 2017b). Nesse sentido, métodos eficientes que garantam mensurar as características oocitárias são essenciais para o desenvolvimento embrionário (MOUSSA et al., 2015).

Assim, para selecionar uma população mais homogênea de oócitos imaturos, a principal técnica utilizada tem sido a classificação morfológica (KAKKASSERY et al., 2010). Esse método consiste na visualização das características das camadas de células do *cumulus* circundantes e do citoplasma oocitário para separação daqueles com melhor aparência. Contudo, esses critérios são bastante subjetivos, pois variam entre laboratórios, sensibilidade e treinamento do observador, bem como não predizem fatores intrínsecos (SANTOS et al., 2016). Por essa razão, métodos específicos e não invasivos, como o ensaio de azul cresil brilhante (Brillant Cresyl Blue – BCB), tornam-se uma alternativa para melhorar a seleção de oócitos imaturos (CASTANEDA et al., 2013; MIRSHAMSI et al., 2013).

Embora oócitos recuperados de folículos antrais sejam imaturos, podem apresentar fases de crescimento diferentes de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular (SANTOS et al., 2016). A partir desse princípio, o BCB avalia a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que está relacionada com o metabolismo energético e, conseqüentemente, crescimento oocitário (MIRSHAMSI et al., 2013). Essa enzima reduz o BCB de azul para incolor. Assim, durante o tempo de exposição ao BCB, oócitos em crescimento não são corados devido à alta atividade da G6PDH; em contrapartida, oócitos crescidos (baixa atividade da G6PDH) são corados em azul e considerados mais competentes para o desenvolvimento embrionário (OPIELA e KAŹSKA-KSIAŹKIEWICZ, 2013).

Em trabalhos que utilizam o BCB normalmente o tempo de exposição varia de 60 a 90 min e o corante é diluído em meio simples na concentração de 26 μ M (CASTANEDA et al., 2013; OPIELA e KAŹSKA-KSIAŹKIEWICZ, 2013). Contudo, essas condições de incubação podem influenciar na eficiência do corante e nas características dos oócitos. Assim, uma redução no tempo de incubação e da concentração do BCB, bem como o estabelecimento do melhor diluidor, poderia favorecer uma maior eficiência desse ensaio.

Portanto, objetivou-se aperfeiçoar os parâmetros adequados (tempo de incubação, concentração e diluidor) do BCB para a seleção eficiente de oócitos imaturos bovinos. Além disso, esse ensaio foi empregado para

avaliar a qualidade de oócitos colhidos de ovários transportados em diferentes temperaturas e tempos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA, no. 23091.001069/2015-79). Assim, dois experimentos foram realizados. No primeiro experimento, foram realizadas diferentes comparações avaliando: (i) tempo de exposição (15 vs. 40 vs. 60 vs. 90 min), (ii) concentração (15 vs. 20 vs. 26 μ M) e (iii) diluidor (NaCl vs. PBS vs. DPBS). Para cada comparação, o melhor resultado foi estabelecido para a análise seguinte. Já no segundo experimento, as melhores condições estabelecidas no primeiro experimento foram usadas para avaliar a qualidade de oócitos recuperados de ovários transportados em diferentes condições de (i) temperatura (25°C vs. 35°C) e (ii) tempo de transporte (2 h vs. 10 h). Na avaliação da temperatura, foi utilizado o tempo de transporte de até 2 h. Posteriormente, a melhor temperatura foi usada para avaliar o tempo de transporte.

Para atender ao desenho experimental, folículos (2–8 mm) de ovários recuperados de fêmeas de abatedouros foram aspirados, usando agulha 21G acoplada a seringa de 5,0 mL. Após a colheita oocitária, estruturas foram selecionadas de acordo com os critérios morfológicos, usando um estereomicroscópio, quanto à presença e à compactação das células do *cumulus* e à aparência do citoplasma. De acordo com Santos et al. (2017b), oócitos apresentando mais de uma camada de células do *cumulus* compactas e citoplasma homogêneo foram considerados viáveis (boa qualidade); em contraste, aqueles com camada incompleta de células do *cumulus* ou desnudos e com citoplasma heterogêneo foram classificados como não viáveis (baixa qualidade).

Em seguida, para o ensaio do BCB, os grupos de oócitos viáveis e não viáveis por critérios morfológicos foram lavados duas vezes em gotas de 200 μ L do diluidor do BCB e mantidos em gotas distintas, ou seja, uma gota para oócitos viáveis e outra gota para oócitos não viáveis, classificados por avaliação morfológica, contendo o corante diluído a 38,5°C. Para cada teste, os oócitos foram distribuídos em quantidades iguais entre as concentrações, tempos de incubação e diluidor empregado. Decorrido cada tempo de exposição, as estruturas foram lavadas duas vezes e avaliadas sob estereomicroscópio. Assim, oócitos que apresentaram coloração azul em seu citoplasma foram considerados como viáveis (boa qualidade); e aqueles com citoplasma incolor foram considerados não viáveis (baixa qualidade). Adicionalmente, quanto aos diluidores utilizados, a solução salina consistiu de NaCl a 0,9%; o PBS foi composto de 8,00 M de NaCl, 0,20 M de KCl, 1,44 M de Na₂HPO₄ e 0,24 M de KH₂PO₄; o DBPS consistiu de 8,00 M de NaCl, 0,20 M de KCl, 1,15 M de Na₂HPO₄, 0,20 M de KH₂PO₄, 0,10 M de CaCl₂, 0,10 M de MgCl₂.6H₂O e 1,0 M glicose.

Finalmente, para a análise estatística, todos os dados foram expressos em médias percentuais e analisados pelo teste exato de Fisher, usando o software Graphpad Instat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA) com significância de P<0,05. Um total de vinte repetições foi realizado, sendo quatro repetições por avaliação de cada condição experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, um total de 308 ovários resultou em 1277 estruturas recuperadas, perfazendo uma média de 4,1 oócitos/ovário. Após a primeira avaliação, destinada a comparar o tempo de exposição dos oócitos ao BCB, o percentual de oócitos viáveis foi similar entre os tempos de incubação de 60 e 90 min. Portanto, 60 min foi tão eficiente quanto 90 min para selecionar oócitos imaturos de boa qualidade (Tabela 1). A redução do tempo necessário para o ensaio de BCB é importante para aperfeiçoar as etapas subsequentes da PIVE, permitindo que os gametas mais competentes, porém ainda imaturos, sejam submetidos mais rapidamente às etapas subsequentes.

Desde que Ericsson et al. (1993) utilizaram pela primeira vez o corante BCB como um método de seleção oocitária em suínos, esse tipo vem sendo empregado para a PIVE em diferentes espécies, incluindo bovinos (CASTANEDA et al., 2013), ovinos (KARAMI-SHABANKAREH e MIRSHAMSI, 2012) e felinos (JEWGENOW et al., 2019). Além disso, o ensaio do BCB também tem sido empregado na seleção de oócitos para outras biotécnicas reprodutivas além da PIVE, como a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (JIA et al., 2019). Em geral, a seleção oocitária representa uma etapa fundamental e de relevância para o sucesso da clonagem. Além disso, os estudos mostram que o ensaio de BCB é uma técnica simples, não invasiva, não prejudicando o desenvolvimento embrionário

Parâmetros do ensaio de BCB

Oócitos	Tempo de exposição (min)				Concentração (μM)			Diluidor		
	15	40	60	90	15	20	26	NaCl	PBS	DPBS
Viáveis	46/158	83/142	98/151	102/139	13/110	47/106	65/109	36/107	63/128	31/129
(%)	(29,1) ^c	(58,4) ^b	(64,9) ^{b,a}	(73,4) ^a	(11,8) ^c	(44,3) ^b	(59,6) ^a	(34,0) ^b	(49,2) ^a	(23,8) ^b

Tabela 1. Estabelecimento dos parâmetros (tempo de exposição, concentração e diluidor) para o ensaio de azul cresil brilhante (BCB) na seleção qualitativa de oócitos imaturos bovinos. ^{a,b,c}: diferem dentro de cada parâmetro do ensaio de BCB. ^{a,b,c}: diferem dentro de cada parâmetro do ensaio de BCB ($P < 0,05$).

e aumentando as taxas de clivagem e blastocistos nas diferentes biotécnicas reprodutivas (SU et al., 2012; MIRSHAMSI et al., 2013).

Existem algumas variações quanto aos protocolos utilizados, sendo necessário não somente padronizá-los, mas também aperfeiçoá-los, visando a uma maior praticidade para a PIVE. Assim, nossos resultados estão de acordo com trabalhos em oócitos bovinos usando 60 min (54,0%, OTERO et al., 2017; 67,7%, SANTOS et al., 2016) e 90 min (54,0%, FAKRUZZAMAN et al., 2013; 65,0%, CASTANEDA et al., 2013). Para as comparações subsequentes, nós consideramos o tempo de 60 min, em virtude desse tempo poder incubar mais rapidamente os oócitos nas etapas posteriores.

Com isso, o tempo de 60 min foi utilizado para a segunda avaliação, ou seja, a concentração do BCB (Tabela 01), o qual mostrou que apenas a concentração de 26 μM foi mais adequada para a seleção oocitária. Como já observado em outros estudos com bovinos (CASTANEDA et al., 2013; FAKRUZZAMAN et al., 2013), essa concentração é a adequada para a permeabilidade do BCB na membrana plasmática durante 60 min. O aumento da

concentração do corante BCB pode afetar a viabilidade celular e, portanto, é importante estabelecer essa concentração para cada espécie (WANG et al., 2012; ALCOBA et al., 2015). Vale destacar que concentrações menores que 26 μM não são eficientes para a avaliação da viabilidade oocitária.

Na terceira avaliação do primeiro experimento, o PBS permitiu uma maior taxa de oócitos viáveis em comparação aos demais diluidores: NaCl e DPBS. Embora diversos trabalhos utilizem o DPBS como diluidor do BCB, é possível que esse interfira na ação do corante devido a sua composição mais complexa, comparada ao PBS (CASTANEDA et al., 2013; FAKRUZZAMAN et al., 2013). Por outro lado, o NaCl possui uma composição mais simples, o que poderia prejudicar a manutenção da qualidade oocitária. Portanto, o PBS pode ser considerado um meio intermediário, suficiente pra manter a qualidade oocitária e, ao mesmo tempo, a atuação do BCB como método de seleção.

No segundo experimento, 168 ovários resultaram em 597 estruturas recuperadas após a verificação da temperatura e do tempo de transporte. Com relação à

Temperatura de transporte dos Ovários e Qualidade oocitária

ovários (°C)	Morfologia convencional (%)	Ensaio de BCB (%)
25	73/105 (69,5)	65/105 (61,9)
35	155/240 (64,6)	151/240 (62,9)

Tabela 2. Percentual (oócitos viáveis/oócitos recuperados) da avaliação da qualidade de oócitos usando a morfologia convencional e o ensaio de BCB e recuperados de ovários transportados a diferentes temperaturas por 2 h. ($P > 0,05$).

Tempos de transporte dos ovários (h)	Qualidade oocitária	
	Morfologia convencional (%)	Ensaio de BCB (%)
2	65/125 (52,0) ^a	87/125 (69,6) ^a
10	74/127 (58,3) ^a	65/127 (51,2) ^b

Tabela 3. Percentual (oócitos viáveis/oócitos recuperados) da avaliação da qualidade de oócitos usando a morfologia convencional e o ensaio de BCB e recuperados de ovários transportados a 35°C em diferentes tempos. a,b: diferem na coluna dentro de cada tempo de transporte dos ovários (P<0,05).

temperatura, os parâmetros quantitativos representados pelas taxas de recuperação (25°C: 21,7% vs. 35°C: 42,9%) e oócitos/ovário (25°C: 2,1 vs. 35°C: 4,6) foram significativamente diferentes, com melhores resultados para 35°C (P<0,05). Contudo, nenhuma diferença foi observada quanto à qualidade oocitária avaliada tanto por critérios morfológicos, quanto pelo ensaio do BCB (Tabela 02). Portanto, embora a qualidade dos oócitos tenha sido semelhante entre as temperaturas, devido a maior recuperação oocitária e maior facilidade de manutenção do transporte a 35°C, ela foi usada para a avaliação dos tempos de transporte.

Finalmente, nenhuma diferença foi observada entre os tempos de transporte quanto aos parâmetros quantitativos: taxa de recuperação (2 h: 41,9% vs. 10 h: 44,5%) e oócitos/ovário (2 h: 3,6 vs. 10 h: 3,9), bem como a qualidade oocitária, usando os critérios morfológicos. O ensaio de BCB foi observado um maior percentual de oócitos viáveis pelo ensaio de BCB transporte por 2 h em comparação ao tempo de 10 h (Tabela 03). Assim, o transporte por 10 h afetou a qualidade intrínseca dos oócitos recuperados, mas não a sua morfologia. É importante a utilização conjunta desses dois métodos de seleção para o melhor sucesso da maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário in vitro.

CONCLUSÃO

O ensaio de azul cresil brilhante foi estabelecido com o tempo de incubação de 60 min, na concentração de 26 µM e com o diluidor PBS para seleção de oócitos bovinos 9 imaturos. Constatou-se que os ovários bovinos são mantidos em melhores condições quando transportados a 35°C por até 2h.

REFERÊNCIAS

ALCOBA, D.D.; CONZATTI, M.; FERREIRA, G.D.; PIMENTEL, A.M.; KUSSLER, A.P.; CAPP, E.; HELENA V.E.C.; BRUM, I.S. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells. *Zygote*, v. 24, n. 1, p. 83-88, 2016.

CASTANEDA, C.A.; KAYE, P.; PANTALEON, M.; PHILLIPS, N.; NORMAN, S.; FRY, R.; D'OCCHIO, M.J. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 79, n. 3, p. 417-22, 2013.

DEUS, A.R.S.; SILVA, M.B.; SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; BORGES, A.A.; PEREIRA, A.F. Influence of storage media during transport of bovine ovaries at 4°C on oocyte recovery and quality. *ARS Veterinaria*, v. 33, n. 2, p. 44-50, 2018.

ERICSSON, S.A.; BOICE, M.L.; FUNAHASHI, H.; DAY, B.N.

Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology*, v. 39, p. 214, 1993.

FAKRUZZAMAN, M.; BANG, J.I.; LEE, K.L.; KIM, S.S.; HA, A.N.; GHANEM, N.; HAN, C.H.; CHO, K.W.; WHITE, K.L.; KONG, I.K. Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte-derived embryos of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science*, v. 142, n. 1-2, p. 19-27, 2013.

JEWGENOW, K.; FERNANDEZ GONZALEZ, L.; JÄNSCH, S.; VIERTTEL, D.; ZAHMEL, J. Brilliant cresyl blue staining allows the selection for developmentally competent immature feline oocytes. *Theriogenology*, v. 126, n. 1, p. 320-5, 2019.

JIA, L.; DING, B.; SHEN, C.; LUO, S.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; DING, R.; QU, P.; LIU, E. Use of oocytes selected by brilliant cresyl blue staining enhances rabbit cloned embryo development in vitro. *Zygote*, v. 27, n. 3, p. 166-172, 2019.

KAKKASSERY, M.P.; VIJAYAKUMARAN, V.; SREEKUMARAN, T. Effect of cumulus oocyte complex morphology on in vitro maturation of bovine oocytes. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 41, v. 1, p. 12-17, 2010.

KARAMI-SHABANKAREH, H.; MIRSHAMSI, S.M. Selection of developmentally competent sheep oocytes using the brilliant cresyl blue test and the relationship to follicle size and oocyte diameter. *Small Ruminant Research*, v. 105, n. 1, p. 244-9, 2012.

LUSTOSA, A.A.; BARBOZA, N.A.; BARBOSA, Y.G.D.S.; RODRIGUES, P.K.O.; NETO, F.D.C.R.M. Aspectos relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização in vitro: revisão. *PUBVET*, v. 12, n. 3, p. 130-6, 2017.

MIRSHAMSI, S.M.; KARAMISHABANKAREH, H.; AHMADI-HAMEDANI, M.; SOLTANI, L.; HAJARIAN, H.; ABDOLMOHAMMADI, A.R. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 4, p. 245-51, 2013.

MOUSSA, M.; SHU, J.; ZHANG, X.H.; ZENG, F. Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". *Animal Reproduction Science*, v. 155, n. 1, p. 11-27, 2015.

OPIELA, J.; KAŹSKA-KSIAŹKIEWICZ, L. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). *Reproductive Biology*, v. 13, n. 3, p. 177-183, 2013.

OTERO, R.; COSTA, P.E.; PEREIRA, E. Maturação nuclear in vitro de ovócitos bovinos selecionados pelo método azul cresil brilhante. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, v. 9, n. 2, p. 345- 54, 2017.

SANTOS, M.V.O.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; PEREIRA, A.F. Influence of the recovery method on the quantitative parameters of bovine oocytes. **ARS Veterinaria**, v. 32, n. 2, 105-9, 2016.

SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; BORGES, A.A.; SILVA, M.B.; PEREIRA, A.F. Influence of the corpus luteum on the recovery of bovine immature oocytes derived from post-mortem females. **Holos**, v. 7, n. 33, p. 278-83, 2017a.

SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; BORGES, A.A.; PEREIRA, A.F. Influence of commercially available follicle stimulating hormone on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1393-1402, 2017b.

SU, J.; WANG, Y.; LI, R.; PENG, H.; HUA, S.; LI, Q.; QUAN, Q.; GUO, Z.; ZHANG, Y. Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 361-381, 2012.

WANG, L.; LIN, J.; HUANG, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; CHEN, T. Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, v. 7, 2012.