



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U. nº 198, de 14/10/2016
AELBRA EDUCAÇÃO SUPERIOR - GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO S.A.

Jackeline Alves de Lima

USO DO CORANTE AZUL DE CRESIL BRILHANTE NA SELEÇÃO DE OVÓCITOS
BOVINOS COMPETENTES PARA A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Palmas – TO

2022

Jackeline Alves de Lima

USO DO CORANTE AZUL DE CRESIL BRILHANTE NA SELEÇÃO DE OVÓCITOS
BOVINOS COMPETENTES PARA A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dr. (a) Ana Luiza Silva Guimarães.

Palmas – TO

2022

Jackeline Alves de Lima

USO DO CORANTE AZUL DE CRESIL BRILHANTE NA SELEÇÃO DE OVÓCITOS
BOVINOS COMPETENTES PARA A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e
apresentado como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina pelo Centro
Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dr. (a) Ana Luiza Silva Guimarães.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Luiza Silva Guimarães

Orientador

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. Dr. Luís Fernando Castagnino Sesti

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Palmas – TO

2022

Em primeiro lugar, dedico a Deus, que através de cada conhecimento adquirido eu possa ajudar pessoas e honrá-lo com minha profissão. Em segundo lugar ao meu pai João da Cruz Santos Lima (*in memoriam*) que onde estiver espero que esteja orgulhoso do que escolhi para minha vida. Não esquecendo neste mesmo lugar dedicar a minha mãe Rosana Alves de Sousa Lima que me deu a chance de ter essa profissão e me apoiou quando decidi o que queria para minha vida. Aos familiares pelo apoio. Ao meu melhor amigo Handley Neickisom F. do Couto, por cada abraço, por me trazer consolo nos momentos mais difíceis, por ouvir cada lamúria, que nossa amizade sempre possa ser assim. Aos demais amigos que se preocuparam e me confortaram, aos mestres e doutores que me ensinaram não somente o conteúdo, porém como amarmos e nos dedicamos ao trabalho que faremos e a termos orgulho. Por último a instituição Ceulp Ulbra onde encontrei uma satisfação que não consigo expor em palavras, mas que me deixará com saudades de cada momento.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pois, sem Ele não teria sobrevivido até aqui. Em segundo lugar, minha orientadora Dr (a): Ana Luiza Silva Guimarães. Lembro do primeiro dia que a procurei estava nervosa, apreensiva achando que esse tema seria uma realidade distante, sentindo-me perdida e prontamente abraçou a causa e se dedicou a me ajudar, mal consigo expressar o quanto sou grata, por tê-la conhecido pela paciência comigo. Ao meu coordenador e professor Dr. Luiz Fernando C. Sesti que sempre me atendeu e procurou me ajudar com cada escolha e por fazer parte da minha banca avaliadora. Grata também ao Dr. Ernane Gerre P. Bastos que aceitou me avaliar, espero me aprimorar com cada conselho. Não sendo menos importante, agradeço a Dra. Juliana Araújo que me forneceu parte do material de pesquisa que foi de imensa ajuda. A acadêmica de medicina veterinária da Universidade Federal do Tocantins, Adriana Cristina Carvalho sua ajuda foi primordial, ao técnico de laboratório Nathanael Antônio e ao Médico Veterinário e Diretor do Laboratório de Produção *in vitro* de embriões Brio Biotecnologia, Juliano Franco, pelo suporte e apoio para delineamento e execução do projeto. Não tenho palavras nem meios para demonstrar o quão grata sou, por todos que contribuíram. Meu muito obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 MATERIAIS E MÉTODOS	8
3 RESULTADOS PARCIAIS	9
4 CONCLUSÃO	11
REFERÊNCIA	

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

USO DO CORANTE AZUL DE CRESIL BRILHANTE NA SELEÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS COMPETENTES PARA A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

USE OF BRILLIANT CRESIL BLUE DYE IN THE SELECTION OF COMPETENT BOVINE OOCYTES FOR IN VITRO EMBRYO PRODUCTION

Jackeline Alves de Lima¹; Dra. Ana Luiza Silva Guimarães²

¹Graduanda de Biomedicina, Ceulp Ulbra, Palmas/TO, 77019-900, jackielima@rede.ulbra.br.

²Professora Adjunta I, Departamento de Medicina Veterinária. Laboratório de Reprodução Animal, Av. Teotônio Segurado, 1501 Sul - CEP 77.019-900 - Palmas/TO, ana.luiza@ceulp.edu.br

Resumo

A PIVE (Produção in vitro de embriões), é uma ferramenta de reprodução assistida que possibilita contato do espermatozoide e ovócito fora do sistema reprodutor de uma fêmea, permitindo formação de um novo indivíduo. Os ovócitos foram obtidos de glândulas do aparelho reprodutor de fêmeas bovinas abatidas, o método de seleção utilizando o azul de cresil brilhante (*Brillant Cresyl Blue-BCB*) aponta células eficazes para uso, já que reagiu a baixa atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), a ação dessa enzima é um forte marcador preditivo de competência, o reagente corou as células sem danificá-las. Portanto, este trabalho teve por objetivo fazer uso desta técnica não invasiva, afim de selecionar células competentes de ovócitos bovinos. Para o experimento, foram coletados ovários de fêmeas bovinas de abatedouro e os folículos de diferentes diâmetros (3-8 mm) foram aspirados separadamente para obtenção dos ovócitos. Estes foram classificados morfológicamente como graus I e II foram incubados em solução de 26 µM de BCB, por 90 minutos em estufa de cultivo celular. Após serem avaliados como BCB+ (alto ++ e moderado + presença de coloração azulada) e BCB- (ausência de coloração azulada) foram distribuídos para a maturação *in vitro* e para produção *in vitro* de embriões. Resultando em 20 COCs para controle, (33,3) 19 (31,6%) complexos cumulus-ovócito (COCs) alto ++, 14 (23,3%) moderados + e 7 (11,6%) não

reagente. Concluindo assim que com amostras de qualidade, o método é confirmatório selecionando células competentes, garantindo uma segurança para selecionar COCs com grandes chances de sucesso para suportar as fases de maturação, fertilização e clivagem *in vitro*.
Palavras-chaves: Fertilização. Ovários. Reagente. Reprodução.

Abstract

The PIVE (In Vitro Embryo Production) is an assisted reproduction tool that allows contact between the sperm and the ovum outside the reproductive system of a female, allowing the formation of a new individual. The oocytes were obtained from glands of the reproductive system of slaughtered bovine females, the selection method using brilliant cresyl blue (Brilliant Cresyl Blue-BCB) indicates effective cells for use, since it reacted to the low activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), the action of this enzyme is a strong predictive marker of competence, the reagent stained the cells without damaging them. Therefore, this work aimed to make use of this non-invasive technique, in order to select competent cells from bovine oocytes. For the experiment, ovaries of female slaughterhouse bovines were collected and follicles of different diameters (3-8 mm) were aspirated separately to obtain oocytes. These were morphologically classified as grades I and II and were incubated in a 26 μ M BCB solution for 90 minutes in a cell culture oven. After being evaluated as BCB+ (high ++ and moderate + presence of bluish coloration) and BCB- (absence of bluish coloration) they were distributed for in vitro maturation and for in vitro production of embryos. Resulting in 20 COCs for control, (33.3) 19 (31.6%) cumulus-oocyte complexes (COCs) high ++, 14 (23.3%) moderate + and 7 (11.6%) non-reagent. Concluding that with quality samples, the method is confirmatory selecting competent cells, ensuring safety to select COCs with high chances of success to support the maturation, fertilization and in vitro cleavage phases.

Keywords: Fertilization. Ovaries. Reagent. Reproduction. Keywords: Fertilization. Ovaries. Reagent. Reproduction.

1 INTRODUÇÃO

Com a expansão gradativa da pecuária mundial, houve uma exigência tanto no mercado interno quanto externo, tornando muito importante a utilização de tecnologias no mercado agropecuário, visando melhorias na qualidade do que é produzido (Inforzato et al., 2008). Slade et al. (2014), afirma que a implantação de biotécnicas reprodutivas no país tem sido meios inovadores, pois tem se mostrado significativo a importância para que ocorra o avanço da pecuária interna, sendo a forma mais rápida e prática de melhorar a produtividade e qualidade de um rebanho. Com as biotécnicas é possível uma melhor expansão de mercado, de mais fácil acesso, principalmente na seleção de materiais genéticos de alta qualidade, assim trazendo

melhorias para a genética animal cada vez mais agregando lucros, qualidade e competitividade de mercado, fazendo com que o Brasil seja o maior produtor e exportador de carne e materiais genéticos, como embriões fertilizados *in vitro*.

Com a demanda crescente para se obter produtos de qualidade técnicas têm sido desenvolvidas em laboratórios, buscando meios de selecionar gametas sem alterar sua funcionalidade, além de tentar mantê-los fora de seu ambiente fisiológico, destacando assim a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), uma biotecnologia que auxilia nesse crescimento mercantil. A maturação, a fertilização e o cultivo *in vitro* são etapas do método de reprodução assistida, que consiste em coletar ovócitos da fêmea animal, fertilizando-os com sêmen no laboratório, seguido de um processo que acompanha até o desenvolvimento embrionário que após alguns dias poderá ser transferido para o útero fêmeas receptoras. (Guimarães, 2013).

No ambiente fisiológico normalmente ocorre uma série de mudanças elementares sob o efeito de hormônios como o FSH (hormônio folículo estimulante) que atua juntamente com o LH (hormônio luteinizante) com o objetivo de que na fase final haja crescimento folicular completando a maturação citoplasmática para assim suportar as fases iniciais de desenvolvimento embrionário (Hafez e Hafez, 2004).

Sendo assim a PIVE simula o que ocorre no ambiente *in vivo*, para desenvolver ovócitos não maturados, através de hormônios, temperatura e tensão de oxigênio, células que foram retirados antecipadamente do ambiente folicular e não estão totalmente competentes ou prontas para serem fecundados (Jee et al, 2009). Para contribuir com a separação de células competentes, usa-se o corante azul de cresil brilhante (BCB) como ferramenta de seleção, não deteriorando os ovócitos nesse processo, visualizando quais têm possibilidade de gerar embriões de qualidade após passarem pelas etapas de maturação, fertilização e clivagem *in vitro*.

O reagente seleciona ovócitos maturados, através da ação de uma enzima, conhecida por glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Guimarães, 2017). Os ovócitos desenvolvidos têm uma atividade baixa desta enzima permitindo assim que sejam corados em azul. Em células imaturas seu efeito é contrário pela grande atividade da enzima presente nas células em desenvolvimento, fazendo com que fiquem incolor mediante ao corante (Queiroz Neta, L.B. et al, 2019).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Ovários foram coletados em abatedouros locais de fêmeas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*), imediatamente após o abate e transportados em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos (estreptomicina - 100µg/mL e penicilina G - 100 UI/mL) à temperatura de 35-36°C. Chegando ao laboratório foi importante observar o tempo de coleta dos ovários desde o abatedouro até o momento da aspiração dos folículos para não exceder o tempo limite de 4 horas. Os complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro com auxílio de seringa de 10 mL acoplada com agulha descartável de calibre 18G.

O material aspirado foi depositado em tubos plásticos de 15 mL e após a sedimentação do mesmo foi retirado 10 mL do líquido folicular sobrenadante, que foi centrifugado por 5 minutos a 37°C e a 700g e utilizado para procura e seleção dos CCOs. O sedimento contendo os ovócitos foi transferido para placas estéreis de poliestireno de 96 mm de diâmetro contendo líquido folicular e avaliado em lupa estereoscópica. Os ovócitos cumulus compactos possuindo pelo menos quatro camadas de células e com citoplasma homogêneo, foram classificados em graus dos 60 COCs graus I e II foram separados em dois grupos, grupo controle (C - 20 CCOs), não submetidos à coloração BCB e grupo tratado com a coloração BCB (BCB – 40 CCOs) onde foram co-incubados em solução a 26µM de azul de cresil brilhante (BCB) preservado em gotas separadas, incubados por 90 minutos a uma temperatura de 37°C. (Tabela I)

Posteriormente ao tempo de incubação, os ovócitos do grupo BCB foram avaliados em lupa esteromicroscópica e categorizados como BCB + moderado; BCB++ alto para as células coradas em azul e BCB-, não reagente. Estas estruturas foram lavadas em 20µM de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) e posteriormente foram separados em cada grupo experimental e submetidos à MIV por 24 horas.

Tabela I - Esquema básico de coloração com Azul de Cresil Brilhante

Ovócitos	Tempo e Temperatura	Classificação de submetidos ao corante
20 Controle	90 minutos	BCB ++
40 BCB	37°C	BCB+
		BCB -

Fonte: Lima, J.

Após a seleção os ovócitos BCB foram usados na etapa de MIV, os complexos cúmulos-ovócitos foram levados para a maturação durante o período de 18 a 24 horas, em uma temperatura variando de 37° a 39°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Depois da maturação, ocorreu a realização da etapa consecutiva de Fecundação *in vitro* (FIV), que se constituiu em preparar e selecionar espermatozoides e co-incubar os gametas, a separação dos espermatozoides viáveis.

Portanto o ambiente teve de proporcionar o correto funcionamento metabólico entre ovócitos e células do cúmulo e manutenção da célula espermática além de realizar a capacitação espermática. O meio utilizado nesta etapa foi o TALP-FERT (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), onde foi adicionado um agente capacitante, como a heparina, que é um glicosaminoglicano que atuou na capacitação espermática. O co-cultivo de espermatozoides e ovócitos decorreu em um período de aproximadamente 18 horas, a uma temperatura de 38,5°C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

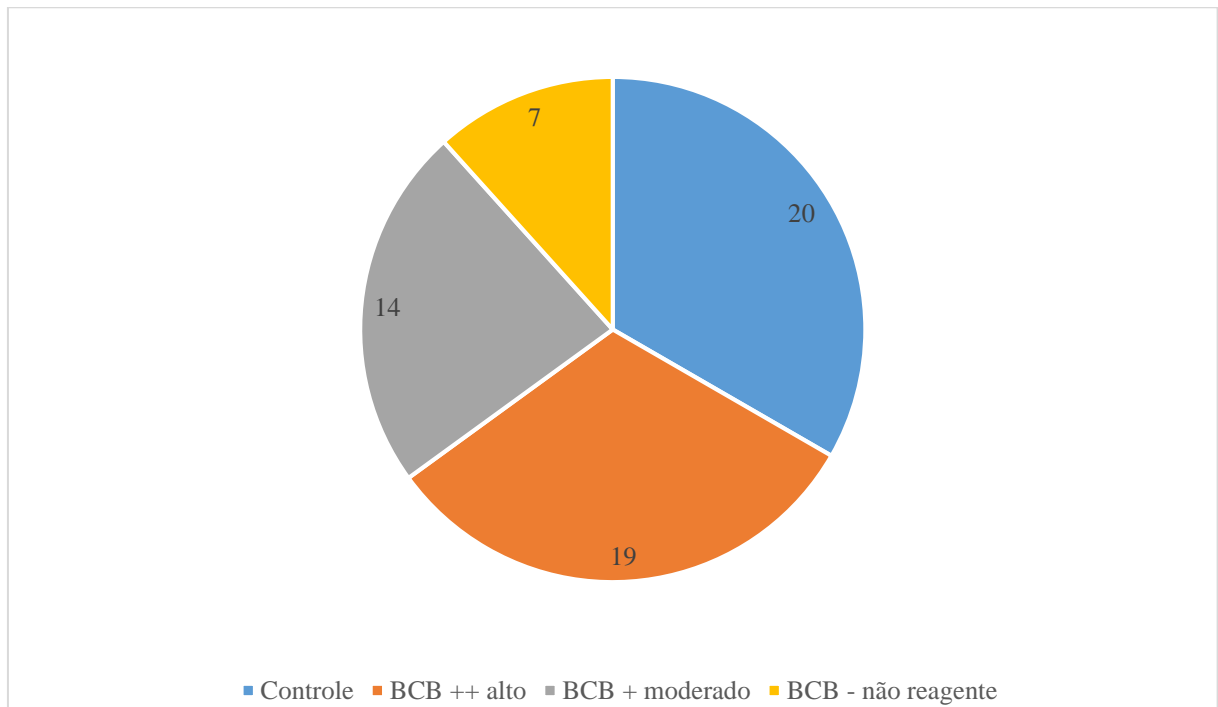
O dia da inseminação foi considerado como D0 (Dia 0). Os possíveis zigotos foram cultivados *in vitro* (CIV) em incubadora e em meio de cultivo elaborado de forma a mimetizar a composição de fluidos uterinos, como o fluido sintético de oviduto (SOFaaci), como meio de predileção. Os possíveis zigotos foram gentilmente pipetados para a remoção das células do cúmulo, lavados duas vezes incubados em estufa a 38,5°C e com 5% de CO₂ em ar. Os embriões foram avaliados em D2 para avaliação da clivagem e em D6, D7 e D8 pós-inseminação (p.i.) para a produção de blastócitos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A avaliação da coloração com BCB, em ovócitos provenientes de folículos com 3-8 mm de diâmetros tiveram maior ($p < 0,05$) percentual de ovócitos BCB ++ positivo alto 19 (31,6%) e moderado + 14 (23,3%), e uma taxa inferior de ovócitos BCB - não reagentes 7 (11,6%). Infere-se que este resultado está em concordância com o que se espera dos folículos utilizados 3-8mm (Gráfico I), pois pode ser um indício que houve menor atividade da enzima G6PDH nestas estruturas, inferindo que esta categoria folicular está na fase final de desenvolvimento. Mota, (2008) relata que a taxa para a seleção de ovócitos exposto ao corante que obtiveram a cor azul do corante são altas para desenvolver um embrião de qualidade. Os resultados foram favoráveis para Arroyo (2008), que obteve em seu trabalho experimental os seguintes resultados: BCBC + 54% e em seu BCB- 46%. Suas amostras foram expostas ao BCB por 60 minutos um tempo diferente deste trabalho, porém a concentração de 26µM de azul de cresil brilhante foi a mesma, seu trabalho também foi desenvolvido em uma placa Nunc, sob placas aquecedoras a 37°C, diferentemente deste trabalho atual que foi incubado para adquirirem competência. Os ovócitos foram submetidos a TMC-199 uma solução tampão com bicarbonato

e L-glutamina, sendo suplementada com soro fetal bovino, piruvato de sódio, sulfato de gentamicina, LH, FSH e estradiol. Sendo incubada em estufa a 38°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade por um dia.

Gráfico I- Quantidade de Ovócitos na avaliação da coloração BCB de CCOS obtidos de folículos 3-8 mm



Fonte: Lima, J.

Após ser avaliando os números dos ovócitos depois de serem corados pelo BCB, os valores seguintes obtidos foram da etapa FIV, onde pode ser observado a taxa de blastocistos e de células destes embriões conseguindo os seguintes, sendo que a taxa percentual está dentro do esperado, as células de controle (ovócitos selecionados pela morfologia) produziram 7 embriões (35%). Comparando com o BCB++ alto que gerou 11 embriões (39%), observa-se que os corados apresentam um percentual maior. O BCB+ moderado, originou 6 embriões (33%). Mantendo-se próximo ao resultado do grupo controle, mostrando que o uso do corante junto a observação morfológica, juntos complementam a técnica de seleção, diminuindo as chances de erros. O BCB- não reagente também tem possibilidade de gerar embriões, mesmo que mínimas, com esta experiência tivemos 1 (14,3%) (Tabela II).

Tabela II - Avaliação de Blastocistos em comparativo com a seleção de Azul de cresil brilhante.

Grupo	Números de COCs	Taxa de (N. total%) Blastocisto	Contagem de células (média)
Controle 3-8mm	20	7 (35%)	115,5
BCB ++ (alto)	19	11 (57,8%)	130,5
BCB + (moderado)	14	6 (42,8%)	136,6
BCB – (não reagente)	7	1 (14,2%)	157

Fonte: Lima, J.

Ericsson et al. (1993) utilizara pela primeira vez o corante BCB como um método de seleção ovocitária em suínos, constatando que o método pode ser utilizado em células reprodutivas de outros animais. O Trabalho de Salviano (2015) aponta presença de ovócitos BCB- durante a MIV que alega que houve a possibilidade de ter sido afetada o desenvolvimento embrionário de Ovócitos BCB+. Seus resultados sugerem que o teste BCB é uma ferramenta eficiente para selecionar ovócitos competentes e que pode ser usado para aumentar o número de blastocistos produzidos por PIV, para apresentar separadamente ovócitos BCB+ e BCB- para MIV e para evitar interações *in vitro* entre competentes e não competentes ovócitos, os valores estão bem próximos comparado a este trabalho que obteve que apresenta porcentagens favoráveis de 57,8 % de BCB alto++, além do valor de BCB+ moderado de 42,8% e somente 14,2% BCB-. Selecionando ovócitos totalmente corados pelo BCB e os BCB moderados também sendo submetidos a MIV, aumenta as taxas de blastocistos. Alm et al. (2005) confirmaram que embriões originados de ovócitos corados BCB++ e BCB+ tem o número maior de células, que os BCB- não reagentes, garantindo a segurança do método para a seleção de ovócitos competentes, trazendo uma taxa numérica positiva de blastocistos.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que foi obtido sucesso nesse experimento, confirmando a eficiência e praticidade para seleção de ovócitos, facilitando a separação por grupos, auxiliando assim, no procedimento eficaz para cada célula pertencente em seu grupo determinando. Além disto, que para um bom desenvolvimento de embriões na produção *in vitro*, necessita de ovócitos de qualidade. Empregando uma técnica bem-feita que garante, os números apontados e a

aplicabilidade do método sendo segura e confiável. Afim que selecionar com o corante azul de cresil brilhante, minimiza a possibilidade de erros na seleção somente por morfologia, trazendo vantagem também, para que não haja possibilidade de aberrações ou inserções mutagênicas, de forma a impactar no desenvolvimento embrionário

REFERÊNCIAS

- AGUILA Luis, TREULEN Favian, THERRIEN Jacinthe, FELMER Ricardo, VALDIVIA Martha and SMITH Lawrence C. 2020 doi: [10.3390/ani10122196](https://doi.org/10.3390/ani10122196)
- DUTTA Rahul, MANDAL Subhamoy, LIN Hsiao-Chun Amy, RAZ Tal, KIND Alexander, SCHNIEKE Angelika, and RAZANSKY Daniel. 2020 doi: [10.1098/rsif.2020.0776](https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0776)
- NETA Luiza Bento de Queiroz, SANTOS Maria Valéria de Oliveira, BORGES Alana Azevedo, PEREIRA Alexsandra Fernandes 2019 DOI: <https://doi.org/10.26694/jibi.v4i1.8373>
- ALCOBA Diego Duarte 2013 URI: <http://hdl.handle.net/10183/72228>
- BUENO, Ataliba Perina; BELTRAN, Maria Paula. Produção in vitro de embriões bovinos, 2008
- GALUPPO, Andrea Giannotti. Breve histórico sobre a técnica de fertilização in vitro para uso em reprodução animal, 2005 <http://repositoriobiologico.com.br/jspui/handle/123456789/337>
- GUIMARÃES, Ana Luiza silva. Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos, 2013
- GUIMARÃES, Ana Luiza Silva. Tese de doutorado em ciências animais, 2017
- HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. Theriogenology, v.59, p.675-685, 2003.
- JEE, B.; CHEN, H.Y.; CHENG, R.; CHIAN, R.C. Effect of a phosphodiesterase type 3 inhibitor in oocyte maturation medium on subsequent mouse embryo development. Fertility and Sterility, v. 91, p. 2037-2042, 2009.
- MELLO, Raquel; FERREIRA, Joaquim; SOUSA, Sabrina; Mello, Marco; Palhano, Helcimar. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos, 2016

SOUZA, Natielly Sampaio de; ABADE, Cristiane Caroline. Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. *Ciência Veterinária UniFil*, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 95-108, mar. 2019.

ARROYO, Rafael José Otero. Immature bovine oocytes classification by the use of Brilliant Cresyl Blue. 2008. 45 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, diagnóstico e controle de doenças; Epidemiologia e controle de qualidade de prod. de) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. URI: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/4962>

MOTA, Gustavo Bruno. Development and gene expression of immature bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue. 2008. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Animais Domésticos; Nutrição e Alimentação Animal; Pastagens e Forragicul) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. URI: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/5567>

H Alm , H Torner, B Lührke, T Viergutz, I M Ghoneim, W Kanitz. Bovine Blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IMV as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. 2005 DOI: [10.1016/j.theriogenology.2004.09.050](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.050)

Inforzato et al., 2008 <https://www.to.gov.br/seagro/noticias/cenario-e-perspectivas-para-o-agronegocio-da-pecuaria-tocantinense/3sgxuljvcw3j>

Hafez, B. Reprodução animal / B. Hafez, E. S. E. Hafez ; [coordenador de tradução da 7. ed. original Renato Campanarut Barnabe]. – Barueri, SP : Manole, 2004

Gonzalez; López-Bejar, M; Izquierdo, D; Paramio M. T. Developmental competence of goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod. Nutr. Dev*, v 43 p179-187, 2003

SHOURBAGY, S.H.E.; SPIKINGS, E.; FREITAS, M.; JOHN, J.C.S. Mitochondria directly influence fertilization outcome in pig. *Reproduction*, v.131, p.233-245.2006.

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.