

# EFEITO DO RESFRIAMENTO NA PLOIDIA DE OVÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO*

HÉLDER SILVA E LUNA,<sup>1</sup> IRIS FERRARI<sup>2</sup> E RODOLFO RUMPF<sup>3</sup>

1. Professor do Departamento de Biociências da UFMS/Campus de Aquidauana

2. Professora da Faculdade de Medicina da UnB

3. Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Brasília

Departamento de Biociências, UFMS, Campus de Aquidauana, Praça Ns. Imaculada Conceição, 163, CEP 79200-000, Aquidauana, MS.

E-mail: hluna@ceua.ufms.br

## RESUMO

O presente estudo objetivou verificar o efeito do resfriamento de ovócitos bovinos em diferentes estágios de maturação na ploidia. Ovócitos bovinos foram obtidos de ovários de abatedouro e divididos em cinco grupos: grupo-controle (ovócitos não resfriados); grupo 0/4 (ovócitos resfriados a 4°C antes do início da maturação); grupo 0/29 (ovócitos resfriados a 29°C antes do início da maturação); grupo 12/4 (ovócitos resfriados a 4°C após doze horas de maturação); e grupo 12/29 (ovócitos resfriados a 29°C após doze horas de maturação). Os ovócitos permaneceram resfriados por 45 minutos. Em todos os grupos

os ovócitos completaram 24 horas de maturação. Em seguida, as células da corona radiata foram removidas e os ovócitos fixados em lâminas e corados com orceína acética. Não se observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na incidência de metáfase II diplóide entre o grupo-controle (6,0%) e os grupos resfriados a 4°C (8,9%) e 29°C (8,0%) antes do começo da maturação e doze horas após o início da maturação (3,9% e 0,0%, respectivamente). Os resultados sugerem que resfriamento em diferentes períodos de maturação não afeta a ploidia de ovócitos bovinos após completarem 24 horas de maturação *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVES:** Bovinos, diplóide, ovócitos, maturação *in vitro*, resfriamento.

## ABSTRACT

### EFFECT OF COLLING IN DIPLOID OOCYTES AFTER *IN VITRO* MATURATION

The present study aimed to verify the incidence of bovine diploid oocytes when cooled at various maturation stages. Bovine cumulus-oocyte complexes were recovered from ovaries at a local slaughterhouse and divided into five groups: control group (uncooled oocytes), 0/4 h group (oocytes cooled at 4°C before the onset of maturation), 0/29 (composed of oocytes cooled at 29°C before the onset of maturation), 12/4 (cooled 12 h at 4°C after the onset of maturation), and 12/29 h group (cooled 12 h at 29°C after the onset of maturation). The oocytes remained cooled for 45

min. In all groups, the oocytes completed 24 h maturation. Subsequently, the cumulus cells were removed, and the denuded oocytes fixed on slides and stained with aceto-orcein. No differences ( $P > 0.05$ ) in the incidence of diploid metaphase II oocytes were observed between the control group (6.0%) and oocytes cooled at 4°C and 29°C before (8.9% and 8.0%) and after 12 h the onset of maturation (3.9% and 0.0%). These results suggest that the nuclear stage at which bovine oocytes are cooled does not affect the incidence of diploid oocytes after 24 h maturation.

**KEY-WORDS:** Bovine, cooling, diploid, in vitro maturation, oocytes.

## INTRODUÇÃO

Uma das principais causas de mortalidade embrionária em animais domésticos é atribuída às alterações cromossômicas (KING, 1990). Concomitante a essa informação o monitoramento de gametas torna-se importante, uma vez que os sistemas de cultivo *in vitro* estão sujeitos à grande influência de variáveis externas. Entre outras, destacam-se choques térmicos, choques osmóticos, resfriamentos, meios de cultivo, hormônios, tempo de cultivo, pH, osmolaridade, antibióticos, luz, micromanipulações e criopreservação (LECHNIAK et al., 1996; OCAÑA-QUERO et al., 1999; LUNA et al., 2001). Várias anormalidades cromossômicas têm sido relatadas em ovócitos bovinos, podendo-se destacar ovócitos diplóides como a mais freqüente (YADAV et al., 1991; LECHNIAK et al., 2002). Dentre as estruturas do ovócito sensíveis à variação de temperatura, destaca-se o fuso meiótico. O fuso é uma estrutura cuja dinâmica da divisão celular exige a maior integridade possível, uma vez que alterações nesse sistema podem levar a alguma anomalia cromossômica. Nesse sentido, o tempo de manipulação, além da variação de temperatura entre a coleta do ovócito e o seu cultivo *in vitro* devem ser os menores possíveis. Muitos trabalhos têm mostrado efeitos lesivos, ocasionados por variações de temperatura, após a retirada do ovócito do ovário. Entretanto, não se deve ignorar a temperatura de transporte dos ovários antes da aspiração (WANG et al., 1995; SCHERNTHANER et al., 1997).

PICKERING et al. (1990) alertam para o tempo gasto nas manipulações de ovócitos em temperatura ambiente. Os autores encontraram 100% de alterações de fuso em ovócitos humanos mantidos à temperatura ambiente por dez ou trinta minutos, sendo que 60% dos ovócitos mantidos durante trinta minutos apresentaram dispersão cromossômica, quando comparados com ovócitos-controles, mantidos à temperatura de 37°C. AMAN & PARKS (1994), em estudo dos danos no fuso e dispersão cromossômica, verificaram que os ovócitos expostos à temperatura de 4 °C por 10, 20, 30, 45 e 60 minutos apresentaram

desaparecimento completo do fuso, enquanto que 90% dos ovócitos expostos à temperatura de 25°C por 30 minutos mostraram anormalidades na estrutura do fuso ou desaparecimento deste. Ainda observaram que o retorno ao cultivo, por 30 minutos à temperatura de 39°C, de ovócitos que sofreram resfriamento, mostrou substancial regeneração do fuso celular quando comparados àqueles ovócitos que foram resfriados e não retornaram ao cultivo.

O cultivo *in vitro* à temperatura subótima de 37 °C, durante um período de 24 horas de maturação *in vitro*, levou a um aumento da freqüência de ovócitos diplóides, em bovinos, quando comparado ao grupo de ovócitos maturados a 39 °C, pelo mesmo período (OCAÑA-QUERO et al., 1999). O retorno dos ovócitos resfriados à temperatura fisiológica normal, após resfriamento, proporciona nova organização e polimerização das estruturas do fuso celular (MAGISTRINI & SZOLLOSI, 1980; SATHANANTHAN et al., 1992; AMAN & PARKS, 1994), mas não exclui o risco de alterações cromossômicas, em virtude de possíveis erros em sua nova organização (SHAW et al., 2000).

Está evidente que os ovócitos de mamíferos são muito sensíveis à exposição a temperaturas não fisiológicas. Entretanto, também se mostra evidente a capacidade de restauração dos ovócitos quando retornam a temperaturas fisiológicas, em particular as estruturas do fuso. O presente trabalho teve como objetivo verificar a ploidia em ovócitos bovinos resfriados a 4°C ou à temperatura ambiente (29 °C) antes do começo da maturação *in vitro* ou doze horas após o começo da maturação *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de ovários

Para o presente estudo, coletaram-se ovários (n=188) provenientes de dois abatedouros locais. Os ovários foram retirados imediatamente após o abate do animal e imersos em solução de PBS acrescida de 100 UI/ml de penicilina e 50 µg de estreptomicina a 37 °C. Em seguida, procedeu-se

ao seu acondicionamento em caixa térmica para posterior transporte até o laboratório.

#### Aspiração folicular e maturação *in vitro* (MIV)

Fez-se a aspiração de folículos ovarianos cujas medidas variaram entre 2 e 8 mm. Consideraram-se inadequados e, portanto, descartados os ovócitos que apresentavam reduzida quantidade de células da corona radiata, ausência destas (desnudos) ou células expandidas. Introduziram-se os ovócitos selecionados em placas de quatro poços, colocando-se, no máximo, 25 ovócitos por poço. O meio de cultivo foi composto por TCM 199 sem HEPES (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) com 10% de soro fetal bovino, 10 µg/mL de hormônio foliculo estimulante (FSH), 24 U.I. de hormônio luteinizante (LH) e 50 µg/mL de gentamicina. Realizou-se a maturação em estufa úmida com atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> a 39 °C, por um período de 24 horas.

#### Resfriamento

O meio para resfriamento foi composto por TCM 199 com 25 mM de HEPES (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de soro fetal bovino. Colcou-se uma placa diretamente na bancada do fluxo laminar para estabilização da temperatura ambiente a 29±0,5 °C e a outra em uma câmara refrigerada para estabilização a 4,0±0,1 °C. A mensuração das temperaturas foi realizada com medidor automático digital (IOP-therm42). Efetuou-se o resfriamento de forma abrupta, retirando-se os ovócitos do cultivo à temperatura de 39°C e introduzindo-os diretamente no meio resfriado. Também o aquecimento procedeu-se de forma abrupta, recolocando os ovócitos em meio de cultivo a 39°C. Todos os grupos completaram 24 horas de MIV. O período de resfriamento foi de 45 minutos. Constituíram-se cinco grupos: grupo-controle (ovócitos maturados por 24 horas sem qualquer tipo de resfriamento); grupo 0/4 (resfriados antes do início da maturação a 4°C por 45 minutos); grupo 0/29 (resfriados antes do início da maturação à temperatura ambiente por 45 minutos); grupo

12/4 (resfriados a partir de 12 horas do início da maturação a 4°C por 45 minutos); grupo 12/29 (resfriados a partir de 12 horas do início da maturação à temperatura ambiente por 45 minutos). Submeteram-se todos os ovócitos, após completarem 24 horas de MIV, à análise morfológica, de acordo com BOUQUET et al. (1992). Os ovócitos com citoplasma enegrecido, fragmentado, espaço perivitelínico muito alargado ou com ruptura da zona pelúcida foram considerados morfológicamente anormais.

#### Preparação cromossômica

Após a maturação, colocaram-se os ovócitos em solução de hialuronidase a 0,3% por cinco minutos em estufa a 39°C. As células da corona radiata foram removidas por repetidas pipetagens. Para a hipotonização e fixação dos ovócitos, utilizou-se a técnica descrita por TARKOSKI (1966) com pequenas modificações (ECTORS et al., 1995). Os ovócitos, após o desnudamento, foram hipotonizados por imersão em solução de cloreto de potássio a 0,045 M, por um período de cinco minutos. Transferiram-se grupos de cinco ovócitos para lâmina de microscopia, aspirando-se cuidadosamente o excesso de solução hipotônica. Imediatamente, instilava-se uma gota de fixador, preparado com duas partes de metanol e uma de ácido acético e, no momento em que ocorria a expansão do ovócito, instilava-se uma segunda gota do mesmo fixador. Em seguida, uma terceira gota de fixador, preparado com três partes de metanol e uma de ácido acético (3:1), foi instilada sobre os ovócitos. Após a fixação, a lâmina foi seca e submersa em fixador (3:1) por 24 horas. Realizou-se todo procedimento de fixação sob lupa com aumento de 40 X.

#### Análise citogenética

Coraram-se as lâminas com orceína acética a 2 % por trinta segundos. A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 1.000 X. Determinaram-se os estágios nucleares de acordo com XU et al. (1986) e SÜSS et al. (1988). Consideraram-se os estágios

de vesícula germinativa (VG); configuração cromossômica I (CCI); configuração cromossômica II (CCII); metáfase I (MI); anáfase I (AI); telófase I (TI); e metáfase II (MII). Os estágios de MI, AI e TI foram computados juntos. Caracterizou-se MII diplóide quando o número de cromossomo foi  $2n=60$  ou de 50 cromossomos com dois cromossomos X, sem a presença do corpúsculo polar (LECHNIAK et al., 1996).

#### Análise estatística

Quantificaram-se os dados de acordo com a ocorrência ou não da diploidia nos ovócitos estudados. Para analisar os resultados, empregou-se a transformação  $\sqrt{x}$ , em que dentre os ovócitos analisados  $x$  é a proporção de células com a característica em estudo. Para cada tratamento, procedeu-se a cinco repetições. Em seguida, desenvolveu-se análise de variância (ANOVA), em que não se verificaram diferenças significativas nas análises.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Empregaram-se neste experimento 467 ovócitos divididos nos cinco grupos estudados. Após completarem a maturação *in vitro*, verificou-se que 85,0% (68/80), 88,6% (109/123), 90,5% (77/85), 93,0% (80/86), 82,7 (77/93) para os grupos-controle, 0/4, 0/29, 12/4, 12/29, respectivamente, apresentavam-se morfológicamente normais. O teste estatístico aplicado não mostrou diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os grupos. Dos ovócitos utilizados, 89,3% (367/411) apresentaram-se adequados para análise citogenética. A taxa de maturação foi de 81,9% (50/61) para o grupo-controle e 62,9% (56/89), 72,4% (50/69), 71,8% (51/71) e 68,8% (53/77) para os grupos 0/4, 0/29, 12/4, 12/29, respectivamente. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos. A taxa de diploidia foi de 6,0% (03/50) para o grupo-controle e 8,9% (05/56), 8,0% (4/50), 3,9% (02/51) e 0% para os grupos 0/4, 0/29, 12/4, 12/29, respectivamente. Também não se verificou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos.

Existem poucos estudos relacionando resfriamento com ploidia de ovócitos maturados *in vitro* em ruminantes. A maioria dos trabalhos trata de taxas de maturação (AZAMBUJA et al., 1998; SHI et al., 1998). Nesse contexto, MARTINO et al. (1995) resfriaram ovócitos bovinos antes do começo da maturação *in vitro* a várias temperaturas não fisiológicas (30°, 20°, 10° e 0°C) por trinta minutos. Após o aquecimento, cultivaram-se os ovócitos por 24 horas para completarem a maturação. As porcentagens de metáfases II foram 75,3%, 74,0%, 63,3% e 67,9% nos grupos resfriados a 30°, 20°, 10° e 0 °C, respectivamente. Esses resultados são similares aos obtidos no presente estudo, em que as taxas de maturação nos grupos resfriados antes do começo da maturação foram de 62,9% no grupo 0/4 e 72,4% no grupo 0/29, não diferentes entre si. Os resultados indicam que o resfriamento, antes da maturação, não interfere na maturação nuclear do ovócito. Entretanto, os mesmos autores citados relatam que o desenvolvimento a blastocisto foi prejudicado pelo resfriamento, em que ovócitos resfriados a 30°C e 20°C apresentaram uma taxa de desenvolvimento de 24,7% e 26,3% e nos grupos resfriados a 10°C e 0 °C uma taxa de 6,4% e 1,0% respectivamente. Os autores discutem que o resfriamento de 10 °C ou abaixo leva a efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário. Esse parâmetro não foi avaliado, no presente estudo, sendo necessários estudos futuros, nas mesmas condições estudadas, para verificar o efeito do resfriamento ovocitário no desenvolvimento de embriões.

MOOR & CROSBY (1985) resfriaram ovócitos ovinos de 39°C para 12°C em diferentes períodos da maturação *in vitro*, sendo que em cada período os ovócitos permaneciam por três horas, e verificaram que a fase da maturação ovocitária *in vitro* que apresentava maior sensibilidade ao resfriamento compreende entre 8 e 11 horas após o começo da maturação *in vitro*. Nessa espécie, esse período corresponde à fase de transição de VG (vesícula germinativa) para MI. Os ovócitos resfriados a partir de doze horas apresentaram-se menos sensíveis ao resfriamento, o que foi mostrado pela menor taxa de anormalidades da

placa metafásica e fuso. Ressalta-se que, nesse período, grande parte dos ovócitos encontra-se em estágio de MI.

Os resultados obtidos no presente trabalho, antes do começo da maturação (0/4 e 0/29), não levaram ao aumento da incidência de alterações cromossômicas nos ovócitos bovinos após completarem a maturação *in vitro*. Entretanto, o tempo de resfriamento, no presente estudo, foi de 45 minutos *versus* 180 minutos no estudo de MOOR & CROSBY (1985). É possível que o menor tempo de resfriamento possibilite uma restauração das estruturas do ovócito após o retorno ao cultivo, enquanto que em três horas de resfriamento essa recuperação ficaria comprometida. Os ovócitos resfriados após doze horas do começo da maturação (12/4 e 12/29) também não mostraram aumento de alterações cromossômicas.

O resfriamento de ovócitos bovinos em estágio de VG à temperatura de 31 °C e 24 °C não leva a alterações morfológicas do fuso, observado por técnica de imuno fluorescência. Entretanto, ovócitos bovinos resfriados a 4°C por períodos de 10-60 minutos apresentaram somente 31%-42% de fuso normal, respectivamente. Essa redução na taxa de normalidade do fuso foi relacionada com a diminuição na taxa de fertilização (WU et al., 1998).

Neste estudo, apesar das evidências dessas alterações no fuso de ovócitos bovinos resfriados a 4°C em VG, após completarem a maturação *in vitro*, elas não foram suficientes para induzir alterações cromossômicas numéricas. VAN DER

ELST et al. (1993), após verificarem que a criopreservação de ovócitos não levou ao aumento da taxa de aneuploidia em embriões, supuseram que o aspecto morfológico do fuso tem pouca relação ou não é um pré-requisito para a ocorrência de aneuploidias ou poliploidias.

A temperatura estável e sem flutuações durante o cultivo ovocitário ou embrionário é alvo de preocupações constantes entre os pesquisadores. OCAÑA-QUERO et al. (1999) realizaram um experimento com ovócitos bovinos em que um grupo foi maturado *in vitro* a 39°C (controle) e outro cultivado a 37°C por 24 horas. Após término do cultivo e fixação para análise citogenética, observaram 2,5% de metafases diplóides no grupo-controle e 14,3% no grupo cultivado a 37°C. Os autores sugerem que o cultivo à temperatura subótima induz a alterações cromossômicas que subseqüentemente afetarão o futuro sucesso na fertilização e produção de embriões em programas de reprodução assistida.

O presente estudo não mostrou efeito no aumento da incidência de diploidias nos ovócitos resfriados em diferentes períodos da maturação ovocitária *in vitro*. Contudo, a despeito disso, devem-se sempre considerar o tempo de manipulação dos ovócitos, além da aspiração folicular, passando pelos processos de decantação, seleção, lavagem e finalmente incubação no meio de cultivo, para início da maturação, que devem ser realizados sempre o mais rápido possível, evitando-se flutuações na temperatura do meio em que os ovócitos são mantidos.

**TABELA 1.** Ploidia de ovócitos bovinos resfriados após maturação *in vitro*.

*Grupos	Usados	Normais (%)	Analizados	MI/AI /TI	MII (%)	MII Diplóide (%)
Controle	80	68 (85,0)	61	11	50 (81,9)	3 (6,0)
0/4	123	109 (88,6)	89	33	56 (62,9)	5 (8,9)
0/29	85	77 (90,5)	69	19	50 (72,4)	4 (8,0)
12/4	86	80 (93,0)	71	20	51 (71,8)	2 (3,9)
12/29	93	77 (82,7)	77	24	53 (68,8)	0
Total	467	411	367	107	260	14

\*Não houve diferença significativa entre os grupos estudados ( $P > 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

Os ovócitos bovinos resfriados a 4 °C ou 29°C por 45 minutos, em diferentes tempos de maturação *in vitro*, não apresentam aumento da frequência de metáfases II diplóides.

## REFERÊNCIAS

- AMAN, R. R.; PARKS, J. E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 103-110, 1994.
- AZAMBUJA, R. M.; KRAEMER, D. C.; WETHUSIN, M. E. Effect of low temperatures on *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 1155-1164, 1998.
- BOUQUET, M.; SELVA, J.; AUROUX, M. The incidence of chromosomal abnormalities in frozen-thawed mouse oocytes after *in vitro* fertilization. **Human Reproduction**, v. 7, n. 1, p. 76-80, 1992.
- ECTORS, F. J.; KOULISCHER, L.; JAMAR, M.; HERENS, C.; VERLOES, A.; REMY, B.; BECKERS, J-F. Cytogenetic study of bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 44, p. 445-450, 1995.
- KING, W. A. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. **Advances in Veterinary Science Comparative Medicine**, v. 22, p. 151-160, 1990.
- LECHNIAK, D.; SWITONSKI, M.; SOSNOWSKI, M. The incidence of bovine diploid oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.46, p.267-277, 1996.
- LECHNIAK, D.; KACZMAREK, D.; STANISLAWSKI, D.; ADAMOWICZ, T. The ploidy of *in vitro* matured bovine oocytes is related to the diameter. **Theriogenology**, v. 57, p. 1303-1308, 2002.
- LUNA, H. S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocyte at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 23-28, 2001.
- MAGISTRINI, M.; SZOLLOSI, D. Effects of cold and of isopropyl-*N*-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. **European Journal of Cell Biology**, v. 22, p. 699-707, 1980.
- MARTINO, A.; POLLARD, J. W.; NAKAGAWA, A.; LEIBO, S. P. The kinetics of chilling sensitivity of bovine oocytes cooled to non-physiological temperatures. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 272, 1995.
- MOOR, R. M.; CROSBY, I. M. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 467-473, 1985.
- OCAÑA-QUERO, J. M.; PINEDO-MERLÍN, M.; MORENO-MILLÁN, M. Influence of follicle, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 51, p. 667-672, 1999.
- PICKERING, S. J.; BRAUDE, P. R.; JOHNSON, M. H.; CANT, A.; CURRIE, J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of meiotic spindle in human oocyte. **Fertility and Sterility**, v. 54, n.1, p.102-108, 1990.
- SATHANANTHAN, A.H.; KIRBY, C.; TROUNSON, A.; PHILIPATOS, D.; SHAW, J. The effects of cooling mouse oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 9, n.2, p.139-148, 1992.
- SCHERNTHANER, W.; SCHMOLL, F.; BREM, G.; SCHELLANDER, K. Storing bovine ovaries for 24 hours between 14 and 21°C does not influence *in vitro* production of blastocysts. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p.297, 1997.

- SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.
- SHI, D. S.; AVERY, B.; GREVE, T. Effects of temperature gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 50, p. 667-674, 1998.
- SÜSS, U.; WUTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 871-880, 1988.
- TARKOSKI, A. K. An air-drying method for chromosome preparations from mouse egg. **Cytogenetics**, v. 5, p. 394-400, 1966.
- VAN DER ELST, J.; NERINCKX, S.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. Association of ultrarapid freezing of mouse oocytes with increased polyplidy at the pronucleate stage, reduced cell numbers in blastocysts and impaired fetal development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 25-32, 1993.
- WANG, S.; HOLYOAK, G.R.; LIU, Y.; BUNCH, T. D. Developmental capacity and nuclear changes of bovine oocytes from ovaries stored for varied times and temperatures. **Theriogenology**, v. 43, p. 347, 1995.
- WU, B.; TONG, J.; LEIBO, S. P. Effect of chilling bovine germinal vesicle-stage oocytes on formation of microtubules and the meiotic spindle. **Theriogenology**, v. 49, p. 177, 1998.
- XU, K. P.; GREVE, T.; SMITH, S.; HYTTEL, P. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 27, p. 505-519, 1986.
- YADAV, B. R.; KING, W. A.; XU, K. P.; POLLARD, J. W.; PLANTE, L. Chromosome analysis of bovine oocytes cultured *in vitro*. **Genetics Selection Evolution**, v. 23, p. 191-196, 1991.