



El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Rodrigo A Urrego¹, zoot; Andrés Pareja¹, zoot; Neil A Vásquez¹, Biol, MSc; María E Márquez¹, Biol, MSc.
¹Grupo de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
memarque@unalmed.edu.co

(Recibido: 12 abril, 2005; aceptado: 15 agosto, 2005)

Resumen

La electroforesis en gel de células individuales o Ensayo Cometa, es frecuentemente usada para medir el daño en el ADN de las células. En la mayoría de estudios, los linfocitos de sangre periférica son utilizados como modelo celular. Sin embargo, en los últimos años, la aplicación de esta técnica se ha extendido a las células germinales, con el fin de evaluar la integridad del ADN espermático, las condiciones de estrés oxidativo en oocitos porcinos y en embriones bovinos; además, la muerte celular en embriones de ratón. Para la realización de la electroforesis de células individuales en un sistema como los oocitos bovinos se hace imprescindible superar dos grandes limitantes en la estructura complejo-cúmulo-oocito (CCOS): una, la degradación de las glicoproteínas de la zona pelúcida y dos, eliminar el nivel de compactación del genoma haploide bovino en metafase II. Dichas limitantes no permiten una migración adecuada del ADN dentro del gel de agarosa. En este estudio se demuestra que el uso de una solución de lisis con proteinasa K durante 3 h y 10 min de corrido electroforético, permite obtener cometas cuantificables de oocitos bovinos madurados in vitro que pueden ser utilizados en estudios genotóxicos en este sistema celular.

Palabras clave: células granulosa, cromatina, quiebre ADN, zona pelúcida.

Introducción

La necesidad de disponer de un gran número de embriones en estadios tempranos, ha motivado el estudio y desarrollo de la producción *in vitro* de embriones, teniendo como consecuencia una alta frecuencia de mixoploidias en los blastocistos producidos *in vitro* (75%) comparado con los producidos *in vivo* (25%) (10). Por tal razón, se ha evaluado diferentes condiciones y medios de cultivo *in vitro* de los oocitos buscando optimizar el proceso de maduración, ya que estos pueden afectar la correcta formación del huso acromático, generando alteraciones cromosómicas (1, 2); lo cual es contraproducente en la producción *in vitro* de embriones.

En mamíferos, las pruebas de genotoxicidad en gametos masculinos se han aplicado ampliamente debido a muchos factores tales como, la facilidad de recolectar las muestras de semen, obtener una amplia

descendencia por individuo y la sensibilidad a diferentes sustancias en los diferentes estadios de maduración. Últimamente, se han empezado a desarrollar ensayos de mutagenicidad basados en células germinales femeninas (13, 29) pues se ha demostrado que muchas aberraciones cromosómicas numéricas presentadas en los primeros estadios embrionarios son inducidas por exposición a mutágenos químicos durante la reanudación meiótica (8,19, 23, 33). Además, se ha informado que aproximadamente el 0.3% de los seres humanos nacidos vivos y hasta el 40-60% de los abortos espontáneos en una etapa temprana de la gestación son causados por aneuploidias y poliploidias (3).

Actualmente, una de las técnicas más utilizadas para evaluar quiebres en el ADN, es la electroforesis en gel de células individuales o Ensayo Cometa,

desarrollado en 1978 como una metodología que permitía estimar el daño en células individuales. Se mezclaban linfocitos humanos con microgeles de agarosa extendida sobre placas portaobjetos, sumergidos en solución de lisis y luego el ADN era desnaturalizado con hidróxido de sodio (22). Posteriormente, Ostling y Johanson (20) introdujeron el corrido electroforético después de lisar las células en el microgel de agarosa, tiñeron el ADN con bromuro de etidio y estimaron el daño usando el grado de la intensidad por la visualización de la fluorescencia del ADN migrado. Singh *et al* (24), refinó la técnica usando condiciones alcalinas para desnaturalizar las estructuras secundaria y terciaria del ADN. Estas nuevas condiciones permitieron la eliminación del ARN y unas condiciones más apropiadas para que el material genético migre durante el corrido electroforético en el gel de agarosa. Para potenciar la sensibilidad de la técnica se realizaron varias modificaciones, por ejemplo, para liberar las proteínas unidas al material genético se introdujo un paso con proteinasa K después de la lisis convencional (26). Aunque existen numerosas técnicas para estimar quiebres en las cadenas de ADN, como la sedimentación en sucrosa alcalina (14), la elución alcalina (18), la sedimentación nucleóide (17); los estudios comparativos, demuestran que el Ensayo Cometa resulta ser la más sensible de las pruebas (28).

El Ensayo Cometa se ha utilizado para evaluar la genotoxicidad de innumerables agentes físicos, químicos y biológicos tales como rayos U.V (6, 7), rayos X, H₂O₂ (24, 25) y acrilamida (32) entre otros. Para todos los anteriores estudios los linfocitos de sangre periférica han sido la fuente usual de muestras. En los últimos años, el uso del ensayo cometa se ha extendido a las células germinales en donde se ha evaluado la integridad del ADN espermático (12), condiciones de estrés oxidativo en oocitos porcinos (31) y embriones bovinos (30); además, también se ha utilizado para evaluar muerte celular en embriones de ratón (5).

Pero la aplicación de dicha técnica en un sistema celular como los oocitos bovinos requiere superar algunas dificultades dadas por la estructura del complejo—cúmulo-oocito (CCO), tales como la eliminación de las células de la granulosa, la degradación de la Zona Pelúcida y la disminución de la compactación de la cromatina. Estas particularidades del oocito crean la necesidad de estandarizar un protocolo para la obtención de cometas adecuados para realizar estudios clastogénicos en el gameto femenino. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar

modificaciones en las condiciones de lisis, ya informadas por otros autores, y del corrido electroforético con el fin de lograr cometas con morfología adecuada para evaluar daño en el ADN de oocitos bovinos madurados *in vitro*.

Materiales y métodos

Obtención de los oocitos bovinos

Los ovarios bovinos fueron recolectados de hembras sacrificadas en la Central Ganadera de Medellín, estos fueron seleccionados por poseer un cuerpo lúteo, luego se depositaron en una Solución Buffer Fosfato (PBS) estéril para ser transportados a 4°C al Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín para el procesamiento de las muestras.

Cultivo in vitro de los oocitos bovinos

En el laboratorio, bajo condiciones asépticas, se lavaron los ovarios con PBS a 4°C para retirar el material contaminante, luego con Jeringa de 5 ml provista de aguja N° 18, se procedió a la aspiración de los folículos con un diámetro entre 4 y 8 mm, el aspirado se recolectó en un tubo cónico vacío de 15 ml y se mantuvo a 4°C hasta el momento de la selección de los CCOs. Bajo estereomicroscopio se seleccionaron los CCOs de buena calidad según criterios previamente establecidos (9, 21), éstos fueron lavados tres veces en medio simple (medio sin suero bovino fetal)/ Para el proceso de maduración se dispuso 10 CCOs en gotas de 50 µl de medio TCM 199 suplementado con 10% de suero bovino fetal < 27.5 mg/ml de ácido pirúvico, 29.2 mg/ml de glutamina, 1 mg/ml de estradiol y 0.5 g/ml de FSH y 0.5 µg/ml de LI. Las gotas fueron recubiertas con aceite mineral y la maduración se realizó por un período de 24 horas a una temperatura de 38.5°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad relativa del 99% (16).

Ensayo Cometa en oocitos bovinos

Para la realización del Ensayo Cometa en oocitos bovinos se tomó como base el protocolo para embriones bovinos propuesto por Takahashi *et al* (30), con modificaciones en el tiempo de incubación con proteinasa K y en el tiempo del corrido electroforético,

además de la introducción de un paso por una solución ácida de tirodes. También, se estandarizó un proceso rápido para la remoción de las células de la granulosa como se describe a continuación: se utilizaron 20 CCOs maducos, se lavaron con PBS y se desnudaron con tripsina-EDTA al 2.5% (Irvine Scientific), precalentada a 39°C y sometidos a vortex por 3 minutos, luego se seleccionaron los oocitos desnudos y se llevaron a una gota de 50 ml de medio RPMI 1640 completo (con suero bovino fetal) y se lavaron en tres gotas de 50 ml de PBS. Posteriormente, los oocitos desnudos fueron transferidos a una solución ácida de tirodes (pH 2-3) por un tiempo de 5 segundos y luego neutralizados con buffer Tris (4 M de Tris HCl, pH 7.5).

Los oocitos fueron transferidos a una gota de 200 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (en PBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺), los oocitos fueron puestos rápidamente en un portaobjetos tratado previamente con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 0.5% (en PBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) y se incubaron a 4°C por 5 min, con el fin de solidificar la agarosa. Posteriormente, los portaobjetos con la agarosa solidificada se incubaron en un buffer de lisis (10 mM de Tris, pH 10, Sarcosinato de sodio, 2.5 mM de NaCl, 100 mM de Na₂-EDTA, 1% de Tritón X - 100 y 10 mg/ml de proteinasa K) a temperatura ambiente durante los siguientes tiempos: 3, 5 y 24 horas, además se realizó un grupo con lisis convencional (sin proteinasa K). Los portaobjetos fueron puestos en una unidad de electroforesis horizontal con buffer de electroforesis (1mM Na₂-EDTA, 300mM de NaOH) y fue llenada hasta un nivel de 0.25 cm, sobre los portaobjetos e incubados por 30 minutos. La electroforesis fue corrida a 25 V y 300 mA y los tiempos de corrido evaluados fueron 10, 20 y 30 minutos utilizando una fuente de poder compacta. Después del corrido electroforético, los portaobjetos fueron neutralizados con buffer Tris por 15 minutos a temperatura ambiente y teñidos luego con bromuro de etidio (20 g/ml). La observación de las placas se hizo en un microscopio Olympus provisto de un sistema de fluorescencia y fotografiadas con una cámara digital Pixera modelo VCS 10132. Todos los pasos fueron realizados bajo luz amarilla para prevenir daño adicional al ADN.

Resultados

La morfología de los cometas obtenidos de oocitos bovinos sometidos a una solución de lisis sin proteinasa K y sin ser tratados previamente con una solución ácida

de tirodes resultó no ser muy adecuada para la cuantificación de daño en el ADN, ya que no se presentaron cometas con una cabeza y una cola definida (véase Figura 1). Los resultados fueron los mismos utilizando los diferentes tiempos de corrido electroforético (10, 20 y 30 minutos).

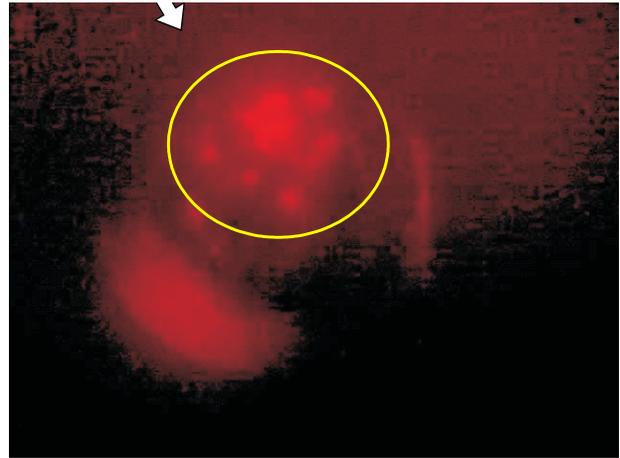


Figura 1. Cometa de oocito bovino madurado *in vitro*, sometido a una solución de lisis sin proteinasa K y 30 minutos de corrido electroforético. Las agrupaciones posiblemente pueden corresponder a cromosomas con un alto grado de compactación.

La morfología de los cometas obtenidos de oocitos bovinos sometidos a un paso por una solución ácida de tirodes y a una solución de lisis con proteinasa K tuvieron una morfología adecuada presentando cabeza y cola definida (véase Figura 2); no hubo diferencias entre los diferentes tiempos de proteinasa evaluados (3, 5 y 24 horas), pero si hubo diferencia entre los diferentes tiempos de corrido electroforético (véase Figura 3).

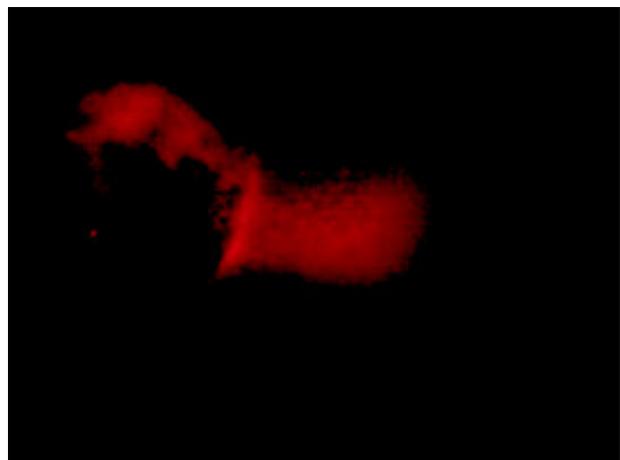


Figura 2. Cometa de oocito bovino madurado *in vitro*, sometido a una solución de tirodes y a una solución de lisis con proteinasa K y 10 minutos de corrido electroforético con una cabeza y una cola definida, lo que evidencia una migración homogénea del ADN dentro del gel de agarosa.

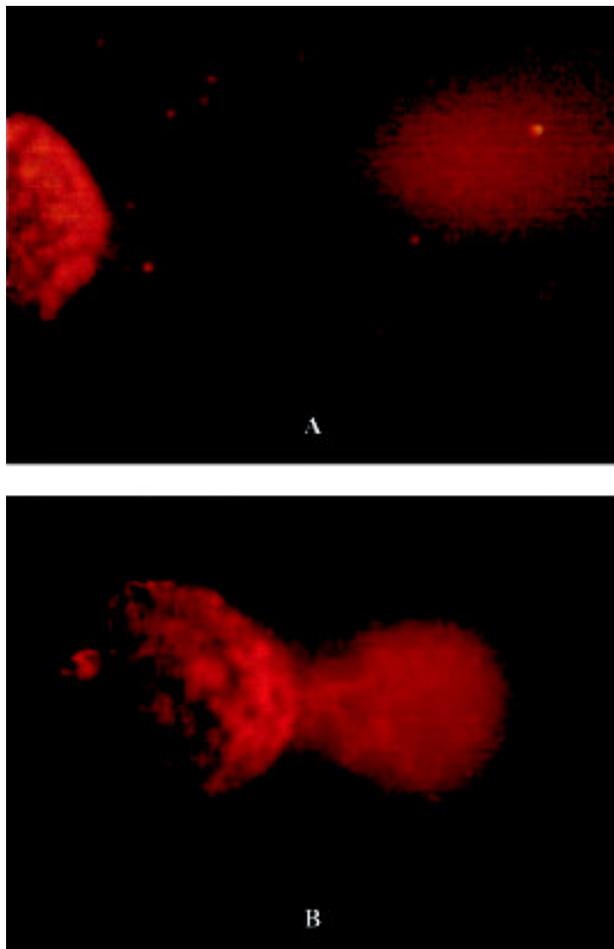


Figura 3. Cometas de oocitos bovinos. A. Muestra una cola alejada de su correspondiente cabeza, a los 30 minutos del corrido electroforético. B. Cometa obtenido después de 10 minutos

Discusión

A pesar de que se ha informado un amplio uso de esta técnica en la evaluación de sustancias genotóxicas en células de mamífero, como linfocitos de sangre periférica humana (27), espermatozoides (12), embriones (5, 30) y oocitos porcinos (31), en Colombia, este es el primer informe del Ensayo Cometa en oocitos bovinos a partir de modificaciones realizadas al protocolo de Takahashi *et al* (30) utilizado para embriones bovinos.

La morfología de los cometas obtenidos de oocitos bovinos, fueron diferentes en ausencia o presencia de proteinasa K (10mg/ml). En la figura 1 se muestra un cometa correspondiente a un oocito bovino madurado *in vitro* tratado con una solución de lisis sin proteinasa K. Estos resultados revelan la falta de migración del ADN en el gel de agarosa debido probablemente a la

presencia de proteínas asociadas al material genético, las cuales contribuyen a su compactación. Esta, es debido a que la división meiótica no está interrumpida por una interfase y los cromosomas no se descondensan después de la emisión del primer cuerpo polar, por lo tanto, en la maduración de los oocitos los cromosomas pasan del estado de diplotene de la profase I a metafase II donde ocurre el segundo arresto meiótico y en esta fase los cromosomas poseen una significativa compactación (4,15, 34).

Los cometas obtenidos con oocitos bovinos madurados *in vitro* y tratados con una solución de lisis que no contiene proteinasa K, indican que estas condiciones no son suficientes para eliminar las proteínas unidas al ADN, lo cual mantiene a la cromatina en un alto grado de compactación que impide la desnaturalización del ADN requerida para la obtención de cometas con una morfología adecuada para evaluar daño genotóxico en este sistema celular. Por el contrario, en la figura 2 se muestran cometas de oocitos bovinos madurados *in vitro* tratados con una solución de lisis en presencia de proteinasa K, estos poseen una morfología adecuada para evaluar el daño clastogénico del ADN; por esta razón, se requiere del uso de esta proteasa en el protocolo. Además, no se encontró diferencia entre los tres tiempos evaluados de exposición (3, 5 y 24 h) a la proteinasa K.

Los cometas de oocitos bovinos obtenidos en estas condiciones son cuantificables y son similares a los obtenidos por Tatemoto *et al* (31), Takahashi *et al* (30) y Dusan *et al* (5) en oocitos porcinos, embriones bovinos y de ratón, respectivamente. Las principales limitantes encontradas en la adecuación del ensayo cometa en oocitos bovinos fueron, la presencia de las glicoproteínas contenidas en la zona pelúcida y la alta compactación de la cromatina después de la maduración, las cuales representan un impedimento físico para la migración del ADN en el gel de agarosa. La zona pelúcida es una gruesa cubierta glicoproteica extracelular que circunda al oocito de los mamíferos, aparece durante su crecimiento y aumenta con el diámetro del oocito, esta puede contener alrededor de 3ng de proteínas estructurales (34), las cuales deben de ser eliminadas para permitir la migración del material genético de la célula germinal femenina. Por esta razón, después de la eliminación de las células de la granulosa con tripsina se trataron los oocitos durante 10 segundos con una solución ácida de tirode's utilizada habitualmente para realizar biopsia de embriones (11). Estas condiciones permitieron degradar gran parte de

la zona pelúcida sin comprometer el resto el oocito, como se puede apreciar en la figura 2.

La figura 3 muestra una comparación entre dos de los diferentes tiempos en los que se realizó el corrido electroforético. La parte A de la figura corresponde a un cometa en donde la electroforesis se realizó por un tiempo de 30 minutos, evidenciando una cola alejada de su correspondiente cabeza, lo cual no es adecuado para una evaluación genotóxica, ya que se dificulta la cuantificación del daño, igual morfología se encontró cuando el corrido electroforético se realizó por un tiempo de 20 minutos. Lo que contrasta con lo observado en la figura 3B, donde se muestra que la introducción de una solución de lisis con proteinasa K por 3 horas y un corrido electroforético por 10 minutos permite obtener unos cometas de oocitos bovinos madurados *in vitro* con una morfología adecuada para ser cuantificados de acuerdo a los criterios establecidos por Takahashi *et al* (30), Dusan *et al* (5) y Tatemoto *et al* (31) y ser utilizados en estudios genotóxicos en este sistema celular.

Por lo anterior, al lograr en este trabajo la estandarización del Ensayo Cometa en oocitos bovinos, nos pone a la vanguardia en Colombia en el uso de gametos femeninos para estudios genotóxicos de sustancias utilizadas en los protocolos de reproducción asistida y en la evaluación de sustancias farmacéuticas,

que podrían causar un potencial daño en el ADN, lo que puede conducir a fracasos reproductivos, tanto en las especies de interés pecuario como en el ser humano.

Además, se logró adecuar unas condiciones que permiten la realización del Ensayo Cometa en células germinales femeninas, lo cual amplía la gama de posibilidades en la evaluación de agentes químicos, físicos y biológicos o en condiciones de estrés oxidativo, que podrían inducir daños en el ADN de oocitos; lo cual es de suma importancia para la identificación de sustancias con un potencial riesgo para la población humana. Además, esta prueba puede ser usada para evaluar las condiciones de cultivo en la maduración de oocitos, siendo esto un proceso crítico en la producción *in vitro* de embriones en muchas de las especies de interés pecuario.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la División de Investigaciones Medellín (DIME) por financiar este trabajo, además de los laboratorios de Biotecnología Animal y Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por prestar sus instalaciones y a la central ganadera de Medellín.

Summary

The Comet Assay: a technic to evaluate genotoxicity in DNA bovine oocytes.

The single cell gel electrophoresis or the comet assay is used to measure the DNA damage of individual cells, for most studies the lymphocytes from peripheral blood are used as cellular model. However, during the last years, the application of this technique has been extended to the germinal cells with the purpose of evaluating the integrity of the spermatid DNA, oxidative stress conditions in boar oocytes and bovine embryos besides cellular death in mouse embryos. Applying the comet assay to a system such as the bovine oocytes it becomes indispensable to overcome two big structural barriers in the cumulus-oocyte-complex (COC): first, the degradation of the glycoproteins in the zona pellucida and second, the elimination of the flatten level of the haploid metaphase II bovine oocyte genome. These obstacles do not allow an appropriate migration of the DNA through the agarose gel. In this study it is demonstrated that the use of a lysis solution with proteinase K during 3 h and 10 min in electrophoretic running allows to obtain quantifiable comets of bovine oocytes matured in vitro, which can be used in genotoxic studies.

Key Words: *chromatin, DNA strand break, granulosa cells, zona pellucida.*

Referencias

1. A'arabi SY, Roussel J.D, Chandler JE. Chromosomal analysis of mammalian oocytes matured in vitro with various culture systems. *Theriogenology* 1997; 48:1173-1183.
2. Beker ARCL, Zeinestra E, Colenbrander B, Bevers MM. Effect of addition of 17 α - estradiol during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent blastocyst formation. *Theriogenology* 2002; 58: 1663-1673.

3. Bond DJ, Chandley AC. Oxford Monographs on Medical Genetics. No 11. Aneuploidy. Oxford University Press. Oxford. 1983.
4. Dekel N. Protein phosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. Reviews Reproduction 1996; 1: 82-88.
5. Dusan F, Rejak P, Czikkova S, Il'kova G, Baran V, Koppel J. Induced cell death of preimplantation mouse embryos cultured in vitro evaluated by comet assay. Theriogenology 2003; 60: 691-706.
6. Gedick CM, Even SWB, Collins AR. Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. Int. J. Radiat. Biol 1992; 62: 313-320.
7. Green MHL, Lowe JE, Harcourt SA, Akinluyi P, Rowe T, *et al.* UV-C Sensivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique. Mutat. Res 1992; 273:137-144.
8. Hansmann I, Probeck HD. Detection of nondisjunction in mammals, Environ. Health Perspect. 1979; 31:161.165.
9. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection oocytes and zygotes. Theriogenology 1994; 41:1571-83.
10. Hendriksen PJM, Viuff D, Greve T, Vos PLAM, Mullaart E, *et al.* Effect of the origin of bovine oocytes on cell numbers and numerical chromosome aberration in *in vitro* embryos collected at day 3 post-insemination. Theriogenology 2001; 55: 475.
11. Hlinka D, Dudas M, Herman M, Kalina I. Experimental attempts to extend the current preimplantation genetic diagnosis with individual karyotypization of human blastomeres. Reprod. Nut. Dev 2000; 41:91-106.
12. Huges CM, Lewis SE, Mckelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during percoll preparation on human sperm DNA integrity. Hum Rep 1998; 15: 1240-1247.
13. Katoh MA, Cain CT, Hughes LA, Foxworth LB, Bishop JB, Generoso WM. (1990). Female-specific dominant lethal effect in mice. Mut Res 1990; 230: 205-217.
14. Kohn KW, Erickson LC, Ewig RG, Friedman CA. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. Biochem 1976; 15: 4629-4637.
15. Ledan E, Polanski Z, Terret ME, Maro B. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. Develop Biology 2001; 232: 400-413.
16. Leibfried ML, Critser ES, Parrish JL, Fist NL. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 1989; 31: 6174-6180.
17. Lett JT, Klucis ES, Sun C. On the size of the DNA in the mammalian chromosome. Biophys. J. 1970; 10: 277-292.
18. Lipetz PD, Brash DE, Joseph LB, Jewett HD, Lisle DR, *et al.* Determination of DNA super helicity and extremely low level of DNA strand breaks in low numbers of non radio labeled cells by 40,60-diamidino-2-phenylindol fluorescence in nucleoid gradients, Anal. Biochem 1982; 121: 330-348.
19. Mailhes JB, Young D, London SN. Cytogenetic effects of caffeine during *in vivo* mouse oocyte maturation. Mut Res 1996; 11:395-399
20. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Common 1984; 123: 291-298.
21. Pope CE, Mcrae MA, Plair BL, Keller GL, Dresser BL. In-vitro and in- vivo developmental of embryos produced by in vitro maturation and in -vitro fertilization of cat oocytes. Journal of Reproduction and Fertility 1997; 51 :69-82.
22. Rydberg R, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanwalt PC, Friedberg EC editors. DNA Repair Mechanisms. New York : Academic Press; 1978 p. 465-468.
23. Shimada T, Watanabe T, Endo A. Potential mutagenicity of cadmium in mamalian oocytes. Mut. Res 1976; 40: 389-396.
24. Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Expl Cell Res 1988; 175:184-191.
25. Singh NP, Tice RR, Stephens RE, Schneider EL. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. Mutat Res 1991; 252: 289-296.
26. Singh NP, Stephens RE, Schneider LE. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, Int. J. Radiat. Biol. 1994; 66: 23-28.
27. Singh NP, Graham MM, Singh V, Khan A. Induction of DNA single strand breaks in human lymphocytes by low doses of Gamma Rays, Int. J. Radiat. Biol 1995; 68: 563-570.
28. Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslink's and apoptosis. Mutat Res 2000; 455:111-127.
29. Sudman PD, Rutledge JC, Bishop JB, Generoso WM. Bleomycin: female-specific dominant lethal effects in mice. Mut Res 1992; 296:143-156.
30. Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz M, Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. Theriogenology 2000; 54:137-145.
31. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. Biol Rep 2000; 63: 805-810.
32. Tice R, Chaillet J, Schneider EL. Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges *in vivo*. Exp. Cell. Res 1976; 102: 426-429.
33. Yuan Z, Mailhes JB. Aneuploidy determination in C-banded mouse metaphase II oocytes following cyclophosphamide treatment in vivo. Mut Res 1987; 179: 209-214.
34. Wassarman PM, Albertini DF. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD, editors. The Physiology of Reproduction. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994. p. 79-115.