

Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação

[Quantification of maternal transcripts in bovine oocytes under different maturation systems]

M.M. Pereira^{1,2}, F.Q. Costa¹, A.P. Oliveira¹, R.V. Serapião¹, M.A. Machado^{1,2},
J.H. M. Viana¹, L.S.A. Camargo¹

¹Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco
36038-330 – Juiz de Fora, MG

²Universidade Federal de Juiz de Fora – Juiz de Fora, MG

RESUMO

Comparou-se a quantidade relativa de transcritos de origem materna entre oócitos bovinos maturados *in vivo* e maturados em diferentes condições *in vitro*. Avaliou-se também o efeito dos sistemas de maturação *in vitro* sobre a viabilidade das células do *cumulus*. Para a maturação *in vivo*, os oócitos foram coletados 19-20h após aplicação de gonadorelina em doadoras superestimuladas com FSH e sincronizadas com implante de progesterona. Para a maturação *in vitro*, oócitos imaturos, obtidos de ovários coletados em matadouro, foram maturados sob diferentes tensões de oxigênio e suplementação proteica. Avaliou-se a abundância dos transcritos de Zar1, MATER e GDF9 por PCR em tempo real. A viabilidade das células do *cumulus* de oócitos maturados *in vitro* foi analisada pela coloração de Azul de Tripán. Observou-se sub-regulação ($P < 0,05$) dos transcritos em oócitos submetidos às diferentes condições de maturação *in vitro* em relação aos maturados *in vivo*. Não houve diferença ($P > 0,05$) na viabilidade das células do *cumulus*. Conclui-se que o sistema de maturação influencia a quantidade de transcritos de origem materna armazenados no citoplasma de oócitos bovinos.

Palavras-chave: bovino, maturação *in vitro*, expressão gênica, gene de efeito materno, soro, oxigênio

ABSTRACT

The relative abundance of maternal transcripts among bovine oocytes *in vivo* matured or under different *in vitro* conditions was compared. Viability of *cumulus* cells of *in vitro* matured oocytes was also evaluated. For *in vivo* maturation, oocytes were recovered from 19 to 20h after gonadorelin injection in donor cows, which were previously superstimulated with FSH and synchronized with progesterone implant. For *in vitro* maturation, immature *cumulus*-oocyte complexes, obtained from ovaries collected at slaughterhouse, were matured under different oxygen tensions and protein supplementation. Relative amount of Zar1, MATER, and GDF9 transcripts were analyzed by real time PCR. *Cumulus* cell viability was analyzed by trypan blue. The expression of maternal effect genes were down-regulated ($P < 0.05$) in oocytes matured under different *in vitro* conditions when compared to those *in vivo* matured. There was no difference ($P > 0.05$) on *cumulus* cell viability among different *in vitro* maturation conditions. In conclusion, different maturation conditions affect the relative abundance of maternal transcripts stored into oocyte cytoplasm.

Keywords: cattle, *in vitro* maturation, gene expression, maternal effect gene, serum, oxygen

INTRODUÇÃO

Na produção *in vivo* de embriões bovinos, aproximadamente 80% do oócitos ovulados

desenvolvem-se até blastocisto, enquanto na produção *in vitro* (PIV) apenas 40% atingem esse estágio (Lonergan e Fair, 2008). O ambiente de maturação *in vitro* (MIV) influencia essa baixa taxa, uma vez que a PIV que utiliza esses

oócitos é menos eficiente que a de oócitos maturados *in vivo* (Rizos et al., 2002; Bertagnoli et al., 2004). Experimentos anteriores verificaram que oócitos obtidos de maturação *in vivo*, após estímulo hormonal com FSH e GnRH, são mais competentes em se desenvolver até blastocistos do que os maturados *in vitro* (Van de Leemput et al., 1999; Humblot et al., 2005), o que sugere que a MIV deve determinar condições subótimas para o desenvolvimento de oócitos imaturos.

A maturação dos complexos *cumulus*-oócitos (COC) inclui modificações citoplasmáticas, manutenção de um estoque de proteínas e transcritos e expansão das células do *cumulus*, que podem ser influenciadas pelas condições de cultivo, quando submetidos à MIV (Watson et al., 2000; Warzych et al., 2007). As condições de cultivo comumente utilizadas para a maturação *in vitro* envolvem o uso de 10% de soro e 20% de tensão atmosférica de oxigênio. O soro de vaca em cio (SVC) é rotineiramente utilizado como suplementação proteica na MIV, e o soro fetal bovino (SFB) no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (Camargo et al., 2009). Todavia, o soro possui compostos indefinidos e, quando utilizado no cultivo embrionário, altera a criotolerância e a abundância relativa de transcritos (Rizos et al., 2003). De forma similar, observa-se que o uso de alta tensão de O₂ no cultivo embrionário altera a abundância relativa de mRNAs em embriões (Correa et al., 2008). Contudo, pouco se sabe dos efeitos dessas condições na MIV sobre o estoque de transcritos armazenados no citoplasma do oócito imaturo.

Genes de efeito materno são aqueles responsáveis por codificarem produtos, como mRNA e proteínas, que são estocados no citoplasma de oócitos e vitais para o desenvolvimento inicial do embrião, geralmente até a fase de transição materno zigótica (Lindeman e Pelegri, 2009). Entre esses genes, encontram-se o *Maternal Antigen That Embryo Requires* (MATER) e o *Zygote Arrest 1* (Zar1). O MATER e o Zar1 são genes específicos de oócitos e possuem participação no desenvolvimento embrionário inicial em camundongos. Embriões de fêmeas nulas (nocaute) para o gene Mater não se desenvolvem além de duas células (Tong et al., 2000). De modo similar, embriões de fêmeas nocaute para Zar1 não se desenvolvem além de quatro células

(Wu et al., 2003). Contudo, o papel de ambos os genes no desenvolvimento embrionário bovino ainda precisa ser investigado (Bettegowda et al., 2008). O *Growth differentiation factor* (GDF9) é um fator secretado pelo oócito, o qual influencia a foliculogênese (Eppig, 2001) e é apontado como tendo um papel importante na comunicação oócito-células foliculares e na expansão das células do *cumulus* durante o processo de maturação (Gilchrist et al., 2008). Além disso, o GDF9 na MIV pode aumentar a competência de desenvolvimento dos oócitos, influenciando a produção subsequente de embriões (Hussein et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi comparar a quantidade de transcritos específicos entre oócitos bovinos maturados *in vivo* e oócitos maturados *in vitro* em diferentes condições de cultivo, bem como avaliar a viabilidade das células do *cumulus* entre diferentes condições de maturação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção de oócitos maturados *in vivo*, foram utilizadas vacas mestiças (oito animais, Holandês-Gir), que receberam um implante intravaginal de progesterona (CIDR®, Eazi-Breed CIDRO - São Paulo, Brasil) e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet - São Paulo, Brasil) no dia 0 (D0). No quarto dia, os animais receberam 180mg de hormônio folículo estimulante (FSH; Pluset®, Sero, Itália) em seis doses de decrescentes, com intervalo de 12h. No sexto dia, receberam 0,53mg de cloprostenol sódico (Ciosin®, Cooper - São Paulo, Brasil) e, no sétimo dia, removeu-se o CIDR® e injetaram-se 2,5mg de gonadorelina (Gestran-Plus®, Tecnopec, São Paulo - Brasil). A aspiração folicular foi realizada entre 19 e 20h após a injeção de gonadorelina. Os oócitos foram recuperados por meio de filtro de coleta de embriões, e foram selecionados para a extração de RNA total somente os que possuíam células do *cumulus* expandidas e citoplasma de coloração homogênea.

Para a obtenção de oócitos maturados *in vitro*, foram aspirados folículos com diâmetro entre 2 e 8mm de ovários de fêmeas bovinas mestiças coletados em matadouro. Foram selecionados os COC de graus 1 e 2 (Viana et al., 2004) e

divididos em quatro condições de maturação *in vitro*: G1 (0,1% PVA em 20% O₂); G2 (10% SVC em 20% O₂), G3 (0,1% PVA em 5% O₂) e G4 (10% SVC em 5% O₂). A MIV foi realizada em meio TCM-199 (Gibco, Invitrogen - Califórnia, USA) e 20µg/mL de FSH (Pluset - Barcelona, Espanha), em estufa com 5% de CO₂ a 38.5°C por 21h. Ao final da maturação *in vitro*, oócitos foram selecionados seguindo o mesmo parâmetro descrito para oócitos maturados *in vivo*.

Para a quantificação em PCR em tempo real, os oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* foram expostos à solução de 0,1% de hialuronidase para remoção total das células do *cumulus*. Foram utilizados três *pools* de 10 oócitos para o grupo de maturação *in vivo* e para os grupos de MIV, totalizando 30 oócitos para cada grupo. A extração do RNA foi realizada com o *RNeasy Micro kit* (Qiagen - Hilden, Alemanha), segundo recomendações do fabricante. O RNA foi eluído em água RNase-free, gerando um volume final de 11µL (~55ng de RNA). A transcrição reversa foi obtida com o *kit SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen), usando-se *primer* oligo dT₂₀, segundo recomendações do

fabricante. O volume final foi de 20µL (~14.000ng) de DNA complementar (cDNA). A quantificação relativa foi realizada em triplicata, utilizando-se o aparelho *Real-Time PCR* (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems - Foster City, CA, EUA). As reações foram feitas com *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e 200ng de cDNA. O cDNA foi desnaturado a 95°C por 2min, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15s; 53°C por 30s e extensão a 60°C por 30s. Após PCR, foi realizada análise da curva de *melting* e análise em gel de agarose para confirmar a especificidade do produto gerado. O gene da β-actina foi utilizado com controle endógeno, e os oócitos maturados *in vivo* como calibradores de comparação. Os *primers* para os transcritos de Zar1, MATER, GDF9 e β-actina estão descritos na Tab. 1. A eficiência dos *primers* foi calculada usando-se o programa LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) e utilizada na quantificação relativa dos produtos dos genes. Os resultados foram analisados pelo *software* REST® (Pfaffl et al., 2002), usando-se teste aleatório de realocação fixa em combinações duplas. Considerou-se P<0,05 como nível de significância.

Tabela 1. Sequência dos *primers* específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no *GenBank*

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de pareamento	Tamanho do produto (pb)	Nº de acesso no GenBank/Referência
Zar1	F 5'TGCCGAACATGCCAGAAG3' R 5'TCACAGGATAGGCGTTTGC3'	53°C	188	NM_001076203
MATER	F 5'TAATGACGACGCTGTGTTCTG3' R 5'GCGGTTCTCAGGTTCTTCAG3'	53°C	206	NM_001007814
GDF9	F 5'GACCCCTAAATCCAACAGAA3' R 5'AGCAGATCCACTGATGGAA3'	53°C	120	NM-174681
β-ACTINA	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979

Para avaliar a viabilidade das células do *cumulus* após a maturação *in vitro* em diferentes condições, utilizou-se a coloração com o Azul de Tripán (Sigma) (Jewgenow et al., 1998). As células foram avaliadas visualmente quanto à coloração com auxílio de microscópio óptico (Nikon, 1.25, Tóquio, Japão). A viabilidade celular foi analisada por ANOVA e pelo teste SNK. O nível de significância foi de P<0,05 e os

valores são apresentados como médias ± EP da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo hormonal para obtenção de oócitos maturados *in vivo* resultou, em média, 21,5±4,6 folículos por animal, que produziram 13,7±3,9 oócitos por coleta, resultando em taxa de recuperação de 63,2%. Obteve-se a taxa de

56,3% (n=62) de oócitos que apresentavam células do *cumulus* expandidas e citoplasma homogêneo. Procedimentos semelhantes, com superestímulo com FSH e indução do pico pré-ovulatório de LH com GnRH, foram utilizados em estudos anteriores para obtenção de oócitos maturados *in vivo* (Van de Leemput et al., 1999; Humblot et al., 2005). Os resultados do procedimento adotado no presente experimento foram semelhantes aos de Humblot et al. (2005), que obtiveram 21,6±1,4 folículos por animal, com 10,7±0,9 oócitos por coleta, realizando a coleta 20h após aplicação do GnRH. Contudo, a taxa de recuperação de 45,7% foi mais baixa que a observada no presente estudo.

Em relação aos transcritos maternos, observou-se menor quantidade relativa nos oócitos submetidos às condições de maturação *in vitro* quando comparados com aqueles maturados *in vivo* (Fig. 1). Os transcritos dos genes MATER e GDF9 apresentaram-se sub-regulados em todos os grupos de maturação *in vitro* (P<0,05; Fig. 1), enquanto os transcritos do gene Zar1 apresentaram-se sub-regulados para as condições de maturação que envolvia a suplementação com SVC ou PVA em baixa tensão de oxigênio (5% de O₂) e SVC em alta tensão de oxigênio (20% de O₂), sem alteração para os oócitos maturados com PVA em 20% de O₂ (Fig. 1).

Em camundongos, os transcritos maternos MATER e Zar1 parecem ter papel importante na ativação do genoma embrionário (Tong et al., 2000; Wu et al., 2003). Contudo, a função do produto de ambos os genes ainda não está esclarecida em oócitos e embriões bovinos (Bettegowda et al., 2008). Transcritos de MATER e Zar1 estão presentes em oócitos bovinos a partir de folículos primários (Penetier et al., 2004), e a sua quantidade se reduz com o reinício da meiose, seja pela maturação *in vitro* ou *in vivo* (Thélie et al., 2007). Contudo, variações na quantidade desses transcritos podem não estar associadas à competência do oócito em desenvolver após a fecundação *in vitro* (Mota et al., 2009). Independentemente da função, o presente resultado sugere que transcritos dos genes MATER e Zar1 podem ser afetados pelas condições de maturação *in vitro*. Thélie et al. (2007) verificaram redução abaixo de um terço da quantidade de transcritos poliadenilados durante a maturação, entre eles transcritos do gene MATER e Zar1, porém sem alteração na

quantidade total dos transcritos desses genes. Essas são observações importantes, pois enquanto o alongamento da cauda poli-A causa estabilidade e previne degradação enzimática, o seu encurtamento torna o transcrito traducionalmente inativo (Eichenlaub-Ritter e Peschke, 2002). Brevini et al. (2007) sugeriram haver associação entre a extensão da poliadenilação, estabilidade do mRNA e competência do oócito durante a maturação para assegurar concentração adequada de transcritos, para o desenvolvimento embrionário inicial. O presente estudo utilizou *primer* para formas poliadeniladas (oligo dT₂₀), e as menores quantidades de transcritos observadas nos tratamentos *in vitro* podem estar associadas a falhas dos oócitos maturados *in vitro* em manter concentrações adequadas das formas poliadeniladas dos genes MATER e Zar1.

Curiosamente, a expressão do gene Zar1 nos oócitos maturados com PVA em tensão elevada de oxigênio (20%) foi semelhante (P>0,05) à dos oócitos maturados *in vivo*, embora tenha sido apresentada sub-regulada em quase duas vezes. No cultivo embrionário, um dos efeitos de elevada tensão de oxigênio é a maior formação de radicais livres (Bavister, 1995), o que pode interferir na expressão de genes (Rinaudo et al. 2006; Correa et al., 2008). Todavia, não está claro se pode haver algum envolvimento entre concentração de radicais livres e expressão de transcritos maternos em oócitos submetidos à maturação *in vitro*.

A expressão do gene GDF9 apresentou-se sub-regulada (P<0,001) nos oócitos submetidos às diferentes condições de maturação *in vitro* (Fig. 1). O GDF9 está associado à expansão das células do *cumulus*, induzida pela síntese de ácido hialurônico com participação do FSH (Eppig, 2001), e também à maior competência do oócito (Hussein et al., 2006). Transcritos de GDF9 têm sido encontrados em oócitos e embriões bovinos até estágio de 5-8 células (Penetier et al., 2004). A maior quantidade de transcritos de GDF9 nos oócitos maturados *in vivo* pode ser resultado do ambiente folicular, determinando uma comunicação eficiente entre oócitos e células foliculares para o reinício e a progressão da meiose oocitária. Interessante é que a expansão das células do *cumulus* dos oócitos maturados *in vivo*, pela avaliação visual, foi maior do que nos maturados *in vitro*,

dificultando até a sua identificação e manipulação nas placas de cultivo. Essa observação pode estar associada à melhor comunicação entre oócito e células foliculares dentro do ambiente folicular, via GDF9.

A presença de células do *cumulus* viáveis durante a MIV é importante para o sucesso da

PIV de embriões, sendo a ponte entre o oócito e o ambiente *in vitro* (Tanghe et al., 2002). Neste estudo, observou-se que as diferentes condições de MIV não interferiram na viabilidade das células do *cumulus* (Fig. 2) e, portanto, baixa concentração de oxigênio na ausência de soro pode ser usada sem influenciar a viabilidade dessas células somáticas.

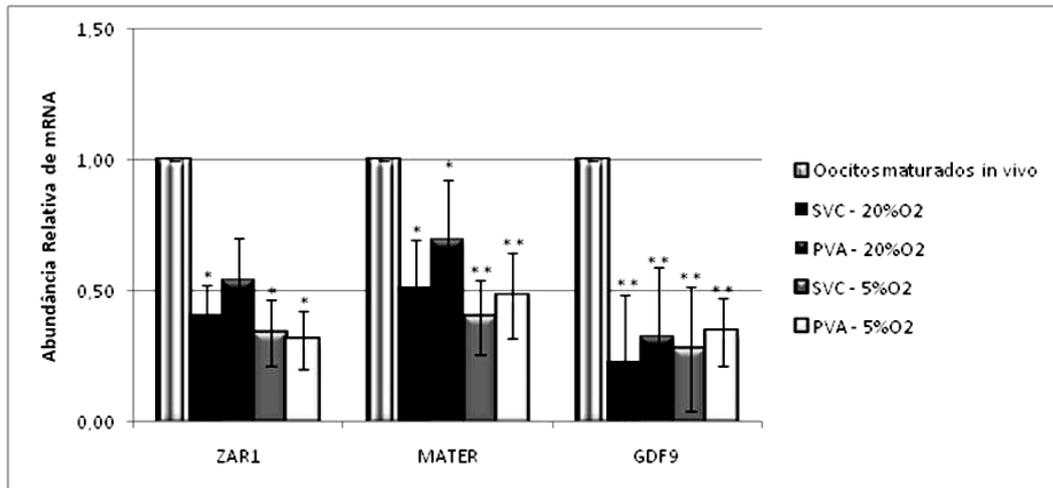


Figura 1. Abundância relativa dos transcritos Zar1, MATER e GDF9 em oócitos bovinos maturados *in vitro* e *in vivo*. Grupos: 10% SVC (soro de vaca no cio) + 20% de O₂; 0,1% PVA (álcool polivinílico) + 20% de O₂; 10% SVC+5% de O₂; 0,1% PVA + 5% de O₂ comparados com oócitos maturados *in vivo* (expressão relativa=1.00) (*P<0,05 e **P<0,001).

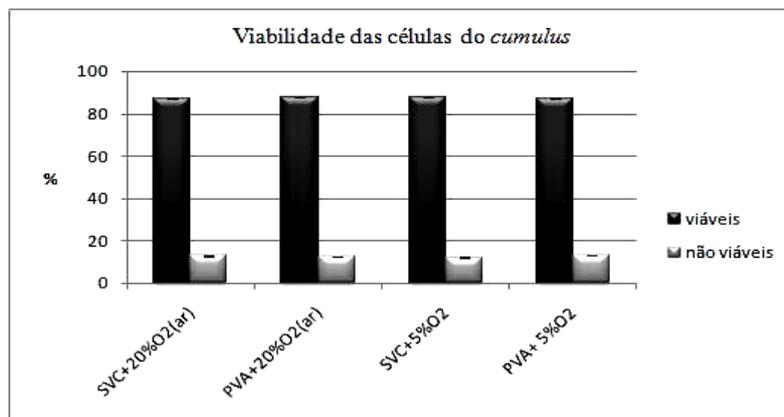


Figura 2. Viabilidade das células do *cumulus* de oócitos bovinos após maturação *in vitro*. Grupos: 10% SVC (soro de vaca no cio) + 20% de O₂; 0,1% PVA (álcool polivinílico) + 20% de O₂; 10% SVC + 5% de O₂ e 0,1% PVA + 5% de O₂. Não houve diferença entre os grupos (P>0,05).

Em resumo, o presente estudo mostrou que oócitos submetidos a diferentes condições de maturação *in vitro*, com diferentes tensões de oxigênio e suplementação sérica, possuem quantidade de transcritos de origem materna alterada quando comparado com oócitos

maturados *in vivo*. Isso pode significar menor quantidade de transcritos disponíveis para uso posterior à fecundação, durante o desenvolvimento embrionário inicial e pode estar associado ao potencial de desenvolvimento do oócito pós-fecundação, uma vez que estudos

anteriores demonstraram que oócito maturados *in vivo* possuem maior capacidade de se tornar blastocistos quando comparados com os maturados *in vitro* (Van de Leemput et al., 1999; Humblot et al., 2005).

CONCLUSÕES

As diferentes condições de maturação *in vitro* influenciam a abundância de transcritos de origem materna armazenados no citoplasma de oócitos bovinos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPEMIG (Projetos CVZ1825/06 e CVZ APQ 1015-5.04/07), pelo apoio financeiro, à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo, e ao matadouro de Juiz de Fora, pela doação dos ovários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update*, v.1, p.91-148, 1995.
- BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C. et al. Interação entre células do *cumulus* e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.488-496, 2004.
- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O.V.; LEE, K. et al. Identification of novel bovine *cumulus* cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biol. Reprod.*, v.79, p.301-309, 2008.
- BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI S. Temporal and spatial control of gene expression in early embryos of farm animals. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.19, p.35-42, 2007.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M. et al. Efeito do citrato e taurina em meio CR2aa no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.88-94, 2009.
- CORREA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.M.D. et al. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, p.132-142, 2008.
- EICHENLAUB-RITTER, U.; PESCHKE, M. Expression *in-vivo* and *in-vitro* growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Hum. Reprod. Update*, v.8, p.21-41, 2002.
- EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v.122, p.829-838, 2001.
- GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update*, v.14, p.159-177, 2008.
- HUSSEIN, T.S.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.*, v.296, p.514-521, 2006.
- JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H. et al. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.*, v.112, p.39-47, 1998.
- HUMBLLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P. et al. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.1149-1166, 2005.
- LINDEMAN, R.E.; PELEGRI, F. Vertebrate maternal-effect genes: insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. *Mol. Reprod. Dev.*, v.77, p.299-313, 2010.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos - Dealing with the warts. *Theriogenology*, v.69, p.17-22, 2008.
- MOTA, G.B.; BATISTA, R.I.T.P.; SERAPIAO, R.V. et al. Developmental competence and expression of the *MATER* and *ZAR1* gene in immature bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue. *Zygote*, v.26, p.1-8, 2009.

- PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C. et al. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol. Reprod.*, v.71, p.1359-1366, 2004.
- PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, v.30, p.26-36, 2002.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.*, v.339, p.62-66, 2003.
- RINAUDO, P.F.; GIRITHARAN, G.; TALBI, S. et al. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.*, v.86, p.1252-65, 2006.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p.234-248, 2002.
- RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, v.68, p.236-243, 2003.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.61, p.414-424, 2002.
- THÉLIE, A.; PAPILLIER, P.; PENNETIER, S. et al. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.*, v.7, p.1-13, 2007.
- TONG, Z.B.; GOLD, L.; PFEIFER, K.E. et al. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat. Genet.*, v.26, p.267-268, 2000.
- VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C. et al. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology*, v.52, p.335-349, 1999.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M. et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.84, p.1-12, 2004.
- WARZYCH, E.; PEIPPO, J.; SZYDŁOWSKI, M. et al. Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, v.97, p.334-343, 2007.
- WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol. Reprod.*, v.62, p.355-364, 2000.
- WU, X.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J. et al. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat. Genet.*, v.33, p.187-191, 2003.