

# **Ekspresi *Transforming Growth Factor-β* dan *Growth Differentiation Factor-9* Oosit Domba yang Divitrifikasi Sesudah dan Sebelum Pematangan *In Vitro***

*(EXPRESSION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β  
AND GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9 ON SHEEP OOCYTES  
VITRIFIED AFTER AND BEFORE IN VITRO MATURATION)*

**Zakiyatul Faizah, Raden Haryanto Aswin**

Departemen Biologi Kedokteran  
Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga  
Jl. Prof. Dr. Moestopo 47, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia, 60132  
Telp. 031-5020125 Ext 1137; email: [zakiyatul-f@fk.unair.ac.id](mailto:zakiyatul-f@fk.unair.ac.id)

## **ABSTRACT**

Oocyte vitrification today became a hope to preserve fertility. Its was a major challenge because of oocyte characteristic in every phase. Immature oocytes were more sensitive to osmotic stress and the membrane was less stable while mature oocytes have spindles that were very susceptible to temperature decrease. The study aim to compare the effect of vitrification before and after *in vitro* maturation to the expression TGF  $\beta$  and GDF9. Oocyte of ewes divided into control groups (K0), K1 maturation prior vitrification, K2 vitrification prior maturation. Vitrification begins with washing oocytes in PBS supplemented of 20% serum for 1-2 minutes, followed by equilibration medium PBS + 20% serum + 10% ethylene glycol for 10-14 minutes, then transferred to 20% serum + PBS + 0.5 M sucrose + 15% ethylene glycol + PROH 15% for 25-30 seconds. Thawing was processed by in the media: 1). PBS + 20% serum + 0.5 M sucrose, 2). PBS + 20% serum + 0.25 M sucrose, and 3). PBS + 20% serum + 0.1 M sucrose. Immunocytochemical stain was performed to evaluate TGF  $\beta$  and GDF9 expression. Remmele scale index (IRS) was used to read the result. TGF  $\beta$  expression both in oocyte and cummulus of K0 and K1 was significant statistically difference ( $p < 0.05$ ) compare with K2. GDF9 expression both in oocyte and cummulus of K0 and K1 was significant statistically difference ( $p < 0.05$ ) compare with K2. We concluded that immature oocyte give better expression of TGF  $\beta$  and GDF9 than mature oocyte.

Key words: TGF  $\beta$ ; GDF9; vitrification; *in vitro* maturation

## **ABSTRAK**

Simpan beku oosit saat ini menjadi sebuah harapan untuk menyelamatkan kesuburan. Simpan beku oosit merupakan tantangan besar karena oosit mempunyai karakteristik pada setiap fasenya. Oosit immatur lebih sensitif terhadap stress osmotik dan membrannya kurang stabil sementara oosit matur berisi benang *spindle* yang sangat rentan terhadap penurunan suhu. Penelitian ini bertujuan untuk melihat ekspresi TGF  $\beta$  dan GDF9 pada oosit dan kumulus yang divitrifikasi sesudah dan sebelum pematangan *in vitro*. Oosit domba dibagi menjadi tiga kelompok, kelompok kontrol (K0), K1 dilakukan pematangan sebelum vitrifikasi, K2 dilakukan vitrifikasi sebelum pematangan. Vitrifikasi dimulai dengan ekuilibrasi oosit dalam PBS + 20% selama 1-2 menit, dilanjutkan dalam PBS + serum 20% + etilen glikol 10% selama 10-14 menit. Oosit kemudian dipindahkan dalam medium vitrifikasi PBS + serum 20% + sukrosa 0,5 M + etilen glikol 15% + PROH 15% selama 25-30 detik. *Thawing* dilakukan dalam media: 1). PBS + 20% serum + sukrosa 0,5 M; 2). PBS + 20% serum + sukrosa 0,25 M; dan 3). PBS + 20% serum + sukrosa 0,1 M. Dilakukan pemeriksaan imunositokimia untuk melihat ekspresi TGF  $\beta$  dan GDF9. Ekspresi TGF  $\beta$  pada oosit dan kumulus kelompok kontrol dan K1 berbeda secara signifikan dibanding K2 ( $p < 0,05$ ). Ekspresi GDF9 pada oosit dan kumulus kelompok kontrol dan K1 berbeda secara signifikan dibanding K2 ( $p < 0,05$ ). Simpulan penelitian ini adalah oosit yang divitrifikasi dalam keadaan immatur memberikan ekspresi TGF  $\beta$  dan GDF9 lebih baik dibanding yang divitrifikasi dalam keadaan matur.

Kata-kata kunci: TGF  $\beta$ ; GDF9; vitrifikasi; pematangan *in vitro*

## PENDAHULUAN

Simpan beku oosit saat ini menjadi sebuah harapan untuk menyelamatkan kesuburan. Simpan beku oosit merupakan tantangan besar karena oosit mempunyai karakteristik pada setiap fasenya. Pada saat immatur oosit belum memiliki benang *spindle* dan materi genetiknya masih terbungkus dalam nukleus, akan tetapi pada fase ini oosit lebih sensitif terhadap stres osmotik, penurunan suhu dan membrannya kurang stabil (Massip dan Donnay, 2003; Men *et al.*, 2003; Gethler *et al.*, 2005.). Oosit matur memiliki benang *spindle*, kromosom dan mikrotubul yang rentan dalam proses pembekuan (Massip dan Donny, 2003).

Ada dua teknik simpan beku yaitu *slow freezing* dan vitrifikasi. Keuntungan vitrifikasi dibanding *slow freezing* adalah: pada vitrifikasi semua langkah terukur dan dapat dilihat, membutuhkan waktu yang lebih singkat dibanding *slow freezing* dan hanya dibutuhkan peralatan yang sederhana untuk mengerjakannya (Brinsden, 2005; Chian dan Quinn, 2010). Vitrifikasi merupakan salah satu teknik simpan beku yang menjanjikan karena dapat memenuhi tiga prinsip keberhasilan simpan beku yaitu tidak terbentuknya kristal es, menghindari efek cairan, dan menghindari syok osmotik (Jain dan Paulson, 2006). Pada vitrifikasi sel hanya terpapar krioprotektan dalam jumlah yang sangat sedikit dan pembekuan berlangsung sangat cepat.

Simpan beku embrio saat ini lebih umum dilakukan dibanding dengan simpan beku oosit. Simpan beku oosit merupakan salah satu cara untuk menyelamatkan kesuburan pada wanita terutama pada mereka yang belum punya pasangan. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan hasil yang tidak konsisten pada fase mana oosit memberikan hasil terbaik untuk dilakukan vitrifikasi. Bogliolo *et al.* (2005), melaporkan bahwa vitrifikasi pada oosit kuda menunjukkan viabilitas yang sama pada oosit yang divitrifikasi dalam keadaan matur dan immatur. Pemeriksaan oosit sapi yang dilakukan vitrifikasi sesudah dan sebelum maturasi *in vitro* dengan menggunakan mikroskop cahaya menunjukkan kualitas sel kumulus, zona pelusida, rongga perivitelin dan sitoplasma yang normal (Faizah *et al.*, 2014)

Pertumbuhan dan perkembangan folikel diatur oleh sintesis dan sekresi beberapa faktor pertumbuhan yang disekresi oleh oosit menuju sel granulosa dan mengaktifkan mekanisme

spesifik folikel melalui regulasi parakrin. Penelitian saat ini menunjukkan peran faktor spesifik oosit yang berupa superfamili *Transforming Growth Factor Beta* (TGF  $\beta$ ), termasuk di dalamnya *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) 15 dan *Growth Differentiation Factor* (GDF9) (Piotrowska *et al.*, 2013). Ada dua sitokin penanda penting dalam maturasi oosit yaitu TGF  $\beta$  dan GDF9. *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF  $\beta$ ) superfamili terekspresi pada sel somatik ovarium mamalia dan pada oosit berbagai tahapan, sehingga berfungsi sebagai regulator intra ovarium pada proses folikulogenesis (Nagashima *et al.*, 2011). *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF  $\beta$ ) superfamili yang penting adalah *Bone Morphogenetic Protein* (BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7 dan BMP 15) serta GDF9 yang terekspresi sepanjang proses folikulogenesis dan sebagai pengatur utama perkembangan dan pertumbuhan folikel (Knight dan Glistler, 2006). Ketiadaan GDF9 menyebabkan folikulogenesis berhenti pada fase folikel primer (Dong *et al.*, 1996).

Anggota TGF  $\beta$  superfamili yang telah diketahui berperan penting dalam maturasi oosit adalah GDF9. Maturasi oosit memegang peranan penting dalam keberhasilan proses fertilisasi *in vitro* dan perkembangan embrio. Pada saat maturasi oosit mensekresi beberapa faktor di antaranya GDF9. *Growth Differentiation Factor* (GDF9) memegang peranan penting dalam pertumbuhan sel teka dan granulosa sekaligus pada diferensiasi dan maturasi oosit (Hreinsson *et al.*, 2002). Lebih jauh lagi, level GDF9 pada cairan folikel berhubungan dengan maturasi inti oosit dan kualitas embrio (Gode *et al.*, 2011).

Pada saat vitrifikasi semua proses metabolisme sel berhenti, sehingga sel dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Proses vitrifikasi diharapkan tidak memengaruhi kematangan Oosit Kumulus Kompleks (OOK), karena OOK yang divitrifikasi sebelum dilakukan *In Vitro Maturation* (IVM), tetap mencapai tingkat maturasi yang sama dengan yang vitrifikasi setelah IVM. Penelitian tentang pengaruh vitrifikasi terhadap maturasi oosit pada sel kumulus dan oosit sampai saat ini belum banyak dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan ekspresi TGF  $\beta$  dan GDF9 sebagai penanda maturasi pada oosit yang divitrifikasi sesudah dan sebelum maturasi *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Pematangan Oosit

Ovarium didapatkan dari rumah potong hewan setempat. Ovarium disimpan dalam NaCl 0,89% yang telah diberi tambahan gentamycin sulfat 50 µg/mL, pada suhu 30-35°C. Koleksi oosit dilakukan dengan melakukan aspirasi pada folikel berukuran 3-5 mm dengan menggunakan jarum 18 G yang dihubungkan dengan spuit 10 mL berisi 1 mL *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang telah diberi tambahan 0,3% *Bovine Serum Albumine* (BSA) dan 50 µg/mL gentamycin. Oosit domba yang digunakan adalah oosit immatur yang memiliki kumulus minimal tiga lapis. Penelitian ini adalah penelitian komparasi eksploratif laboratoris dengan rancangan *post test only control group design*. Oosit dibagi dalam tiga kelompok: (i) kelompok kontrol ( $n=30$ ) oosit hanya dilakukan IVM, (ii) Kelompok 1 ( $n=32$ ), oosit dilakukan IVM dilanjutkan vitrifikasi dan (iii) kelompok 2 ( $n=21$ ), oosit divitrifikasi dilanjutkan dengan IVM. Maturasi *in vitro* menggunakan medium *Tissue Culture Medium* (TCM) 199 dilakukan dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan 38°C, 5% CO<sub>2</sub>, kelembapan 95% selama 24 jam. Oosit yang matur ditandai dengan kumulus yang mengembang, hanya oosit yang matur dilanjutkan untuk dilakukan vitrifikasi. Vitrifikasi dilakukan dengan menggunakan *hemistraw* sehingga krioprotektan yang digunakan sangat sedikit. Vitrifikasi diawali dengan pencucian oosit dalam medium dasar PBS yang disuplementasi serum 20% selama 1-2 menit, dilanjutkan dengan tahapan ekuilibrasi oosit dalam medium PBS + serum 20% + etilen glikol 10% dengan volume 20µL selama 10-14 menit. Oosit kemudian dipindahkan dalam medium vitrifikasi PBS + serum 20% + sukrosa 0,5 M + etilen glikol 15% + PROH 15% dengan volume 10µL selama 25-30 detik. *Thawing* dilakukan dengan mencelupkan *hemistraw* tersebut ke dalam media *thawing*. Oosit direndam secara berturut dalam media: 1). PBS + 20% serum + sukrosa 0,5 M, 100µL; 2). PBS + 20% serum + sukrosa 0,25 M, 20µL; dan 3). PBS + 20% serum + sukrosa 0,1 M, 20 µL

### Pewarnaan Imunositokimia

Eksresi TGF- $\beta$  dan GDF9 dilihat melalui pewarnaan imunositokimia. Pemeriksaan imunositokimia dilakukan dengan melakukan pencucian preparat dengan PBS selama 2x5

menit, dilanjutkan dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 10 menit, diberikan antibodi (monoklonal) primer selama 60 menit, tahap selanjutnya adalah pemberian *biotinylated link* selama 30 menit, dilanjutkan dengan pemberian streptavidin selama 30 menit, kemudian diberi diaminobenzidine (DAB). Chromagen diencerkan 2% dengan DAB plus substrat selama 6-10 menit. Dilakukan pencucian dengan PBS 2x5 menit untuk setiap pergantian tahap untuk membersihkan sisa bahan yang menempel. *Counterstain* dengan methyl green 3 selama 5-10 menit pada suhu ruang kemudian diperiksa di bawah mikroskop cahaya. Hasil pewarnaan dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang dimodifikasi (Novak *et al.*, 2007) yang merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif. Chromagen yang digunakan adalah DAB sehingga bila terjadi ikatan antigen dan antibodi akan memvisualisasikan warna kecoklatan. Ekspresi yang positif ditandai dengan warna kecoklatan (coklat muda untuk ekspresi yang lemah, coklat sedang untuk ekspresi yang sedang dan coklat tua untuk ekspresi yang kuat) pada oosit dan sel kumulus. Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji sidik ragam satu arah.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh vitrifikasi terhadap kematangan oosit yang ditandai dengan adanya ekspresi TGF  $\beta$  dan GDF9. Hasil penelitian terkait ekspresi TGF  $\beta$  dan gambaran imunositokimia pada oosit dan sel kumulus yang divitrifikasi sesudah dan sebelum maturasi *in vitro* disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi TGF  $\beta$  pada kelompok oosit yang divitrifikasi sebelum maturasi *in vitro* menunjukkan hasil paling tinggi dibanding kelompok yang divitrifikasi sesudah maturasi *in vitro* dan kelompok kontrol.

Hasil yang sama didapatkan Widjiati *et al.* (2012) yang mengidentifikasi TGF  $\beta$  pada OOK sapi setelah dimaturasi *in vitro* selama 20 jam. *Transforming Growth Factor Beta* (TGF  $\beta$ ) juga diidentifikasi pada oosit babi yang dilakukan maturasi *in vitro* yang menunjukkan bahwa TGF  $\beta$  berperan penting dalam proses maturasi oosit (Budna *et al.* (2017).

Hasil yang berbeda didapatkan Aruna-

Tabel 1. Ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (TGF  $\beta$ ) pada oosit domba dan kumulus

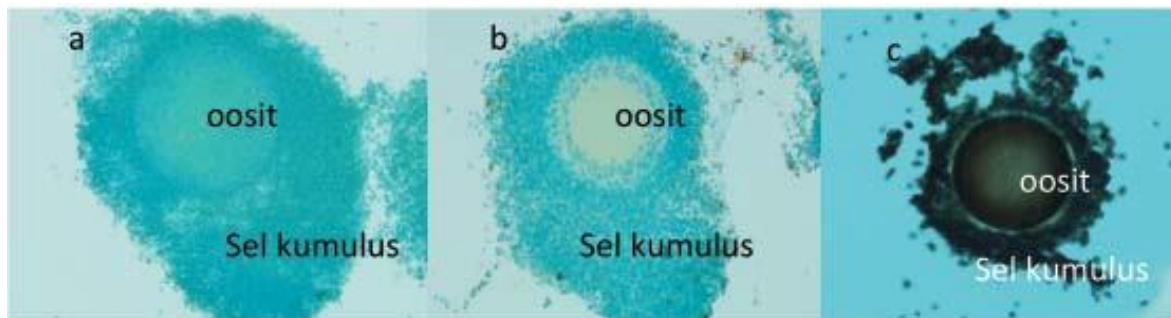
| Kelompok             | Ekspresi TGF $\beta$ oosit $\pm$ SD | Ekspresi TGF $\beta$ kumulus $\pm$ SD |
|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| IVM (K0)             | 4,05 $\pm$ 3,54                     | 3,60 $\pm$ 3,93                       |
| IVM+Vitrifikasi (K1) | 6,15 $\pm$ 2,70                     | 3,10 $\pm$ 3,69                       |
| Vitrifikasi+IVM (K2) | 9,72 $\pm$ 2,76*                    | 8,22 $\pm$ 4,15*                      |

\* = signifikan ( $p < 0,05$ )

Tabel 2. Ekspresi *Growth Differentiation Factor* (GDF9) pada oosit domba dan kumulus

| Kelompok             | Ekspresi GDF9 oosit $\pm$ SD | Ekspresi GDF9 kumulus $\pm$ SD |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| IVM (K0)             | 2,99 $\pm$ 1,57              | 2,68 $\pm$ 1,69                |
| IVM+Vitrifikasi (K1) | 3,58 $\pm$ 1,05              | 1,67 $\pm$ 1,48                |
| Vitrifikasi+IVM (K2) | 9,37 $\pm$ 2,84*             | 8,52 $\pm$ 3,66*               |

\* = signifikan ( $p < 0,05$ )



Gambar 1. Ekspresi *Transforming Growth Factor Beta* (TGF  $\beta$ ) dengan pemeriksaan imunositokimia pada sel kumulus dan oosit domba a. Kontrol b. K1 c. K2. Ekspresi TGF  $\beta$  tampak pada sel kumulus dan oosit yang berwarna kecoklatan (Mikroskop Nikon, 400 kali)



Gambar 2. Ekspresi *Growth Differentiation Factor* (GDF9) dengan pemeriksaan imunositokimia pada sel kumulus dan oosit domba a. Kontrol b. K1 c. K2. Ekspresi GDF 9 tampak pada sel kumulus dan oosit yang berwarna kecoklatan (Mikroskop Nikon, 400 kali)



kumari *et al.* (2010) yang melakukan penelitian pada folikel antral domba. Penambahan TGF $\beta$  pada oosit yang didapatkan dari antral folikel tidak mendukung oosit mencapai tahap MII dibandingkan dengan penambahan *growth factors* yang lainnya.

Hasil penelitian terkait ekspresi GDF9 dan gambaran imunositokimia pada oosit dan sel kumulus yang divitrifikasi sesudah dan sebelum maturasi *in vitro* seperti disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi GDF9 pada kelompok oosit yang divitrifikasi sebelum maturasi *in vitro* menunjukkan hasil paling tinggi dibanding kelompok yang divitrifikasi sesudah maturasi *in vitro* dan kelompok kontrol.

Hasil penelitian yang berbeda didapatkan oleh Azari *et al.* (2017) bahwa ekspresi GDF9 pada OOK sapi yang divitrifikasi sebelum maturasi *in vitro* menunjukkan hasil yang lebih rendah dari kelompok kontrol. Penelitian pada oosit hewan yak (*Bos grunniens*) juga menunjukkan *survival rate* yang lebih tinggi pada kelompok oosit yang divitrifikasi setelah maturasi *in vitro* (Wei *et al.*, 2017). Lebih jauh penelitian untuk melihat ekspresi gen pada oosit yang divitrifikasi dalam keadaan immatur dan matur menunjukkan ekspresi gen yang berbeda, oosit yang divitrifikasi ketika immatur mengekspresikan 12 *upregulator genes* dan 19 *downregulators genes* sementara oosit yang divitrifikasi dalam keadaan matur mengekspresikan 47 *upregulators genes* dan enam *downregulators genes* (Huang *et al.*, 2018).

Hasil yang didapat pada penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Ebrahimi *et al.* (2010) bahwa vitrifikasi yang dilakukan sebelum maturasi *in vitro* dengan menggunakan cryotop tidak berpengaruh pada ekspresi GDF9 dan angka maturasi oosit. Rao *et al.* (2012) juga mendapatkan hasil yang sama, bahwasanya vitrifikasi oosit immatur dengan menggunakan *hemistraw* tidak berpengaruh pada ekspresi GDF9, akan tetapi ekspresi GDF9 yang tinggi justru menurunkan angka maturasi oosit. Chen *et al.* (2014) juga mendapatkan hasil yang sama,

bahwa vitrifikasi pada oosit immatur menunjukkan peningkatan ekspresi GDF9, tapi didapatkan penurunan morfologi oosit, maturasi, dan kemampuan perkembangan oosit pada tahap selanjutnya. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi GDF9 tidak mampu menjaga viabilitas dan perkembangan oosit setelah proses vitrifikasi, akan tetapi pada penelitian ini tidak dilakukan penilaian terhadap

maturasi dan morfologi oosit. Ekspresi GDF9 pada waktu yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda. Ekspresi GDF9 semakin menurun pada maturasi antara 0-24 jam baik pada oosit maupun sel kumulus (Kathirvel *et al.*, 2013).

Tingginya ekspresi TGF $\beta$  dan GDF9 pada kelompok yang divitrifikasi sebelum maturasi *in vitro* menunjukkan bahwa vitrifikasi tidak memengaruhi ekspresi TGF $\beta$  dan GDF9 pada oosit dan sel kumulus. Vitrifikasi tidak merusak oosit, sel kumulus dan komunikasi di antara keduanya. Komunikasi antara sel kumulus dan oosit sangat berperan dalam proses maturasi oosit. Tharasanit *et al.* (2009) menunjukkan bahwa vitrifikasi oosit immatur dengan kumulus kompleksnya mengakibatkan kematian kumulus sel hanya di bagian tepinya saja, bukan pada bagian dalam yang dekat dengan oosit. *Actin sitoskeleton* pada kumulus yang masih hidup juga masih terorganisir dengan baik, begitu juga *gap junction* antar sel kumulus. Oosit dengan gambaran kumulus kompleks yang mengalami kematian pada beberapa tingkatan tetap dapat mencapai maturasi. Faktor yang disekresi oosit terutama anggota TGF $\beta$  superfamily berperan dalam menjaga rendahnya kejadian apoptosis pada sel kumulus dengan cara melokalisir penurunan BMP15 dan BMP6 (Hussein *et al.*, 2005).

## SIMPULAN

Oosit yang divitrifikasi terlebih dahulu lalu dimaturasi memberikan ekspresi TGF $\beta$  dan GDF9 lebih baik dibanding yang dimaturasi kemudian divitrifikasi. Hal ini memberikan harapan memvitirifikasi oosit tanpa didahului proses stimulasi.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian untuk melihat penanda maturasi yang lain dan dilanjutkan dengan fertilisasi *in vitro* untuk mengetahui kemampuan fertilisasi oosit setelah vitrifikasi.

## DAFTAR PUSTAKA

Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. 2010. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology* 74: 884–894

- Azari M, Kafi M, Ebrahimi B, Fatehi R, Jamalzadeh M. 2017. Oocyte Maturation, Embryo Development and Gene Expression Following Two Different Methods of Bovine Cumulus-Oocyte Complexes Vitrification. *Vet Res Commun* 41: 49–56.
- Bogliolo L, Ariu F, Rosati I, Zedda MT, Pau S, Naitana S, Leoni G, Kuwayama M, Ledda S. 2005. Vitrification Of Immature And In Vitro-Matured Horse Oocytes. *Fertility and Development* 18(2): 149-150.
- Brinsden PR. 2005. *Text Book Of In Vitro Fertilization and Assisted Reproductive Technology*. 3rd ed. UK. Taylor & Francis. Hlm. 426.
- Budna J, Celichowski P, Karimi P, Kranc W, Bryja A, Ciesióka S, Rybska M, Borys S, Jeseta M, Bukowska D, Antosik P, Brüssow KP, Bruska M, Nowicki M, Zabel M, Kempisty B. 2017. Does Porcine Oocytes Maturation in Vitro is Regulated by Genes Involved in Transforming Growth Factor Beta Receptor Signaling Pathway?. *Medical Journal of Cell Biology* 5(1): 1-14
- Chen JY, Li XX, Xu YK, Wu H, Zheng JJ, YU XL. 2014. Developmental Competence And Gene Expression Of Immatur Oocytes Following Liquid Helium Vitrification In Bovine. *Cryobiology* 69: 428-433.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383: 531–35.
- Ebrahimi B, Valojerdi MR, Yazdi PE, Baharvand H. 2010. In Vitro Maturation, Apoptotic Gene Expression and Incidence Of Numerical Chromosoma Abnormalities Following Cryotop Vitrification of Sheep Cumulus-Oocyte Complexes. *J Assist reprod genet* 27: 239-246.
- Gode F, Gulekli B, Dogan E, Korhan P, Dogan S, Bige O, Cimrin D, Atabey N. 2011. Influence of Follicular Fluid GDF9 and BMP15 on Embrio Quality. *Fertil Steril* 95: 2274-78.
- Hreinsson J, Scott J, Rasmussen C, Swahn M, Hsueh A, Hovatta O. 2002. Growth Differentiation Factor-9 Promotes The Growth, Development And Survival Of Human Ovarian Follicles In Organ Culture. *J Clin Endocrinol Metab* 87(1): 316-321.
- Huang J, Ma YS, We S, Pan B, Qi Y, Hou YP, Meng QY, Zhou GB, Han HB. 2018. Dynamic Changes in The Global Transcriptome of Bovine Germinal Vesicle Oocytes After Vitrification Followed By In Vitro Maturation. *Reproduction, Fertility and Development* 30(10): 1298-1313.
- Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. 2005. Oocytes Prevent Cumulus Cell Apoptosis by Maintaining A Morphogenic Paracrine Gradient of Bone Morphogenic Protein. *J Cell Sci* 118: 5257-68.
- Jain JK, Paulson RD. 2006. Oocyte Cryopreservation. *J Fertility And Sterility* 86 Suppl 3: 1037-1046.
- Kathirvel M, Soundian E, Kumanan V. 2013. Differential Expression Dynamics of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) and Bone Morphogenetic Factor 15 (BMP15) Mrna Transcript During In Vitro Maturation of Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Cumulus-Oocyte Complexes. *Springerplus* 2: 206.
- Knight PG, Glister C. 2006. TGF- $\beta$  Superfamily Members and Ovarian Follicle Development. *Reproduction* 132: 191-206.
- Massip A, Donnay I. 2003. Cryopreservation of Bovine Oocytes: Current Status and Recent Development. *Nutr Dev* 43: 325-330.
- Nagashima T, Kim J, Li Q, Lydon JP, De Mayo FJ, Lyons KM, Matzuk MM. 2011. Connective Tissue Growth Factor Is Required For Normal Follicle Development And Ovulation. *Molecular Endocrinology* 25: 1740-1759.
- Piotrowska H, Kempisty B, Sosinska P, Ciesiolka S, Bukowska D, Antosik A, Rybska M, Brussow KP, Nowicki M, Zabel M. 2013. The Role of TGF Superfamily Gene Expression in The Regulation of Folliculogenesis and Oogenesis in Mammals: A Review. *Veterinarni Medicina* 58(10): 505–515.
- Rao BS, Mahesh YU, Charan KV, Suman K, Sekhar N, Shivaji. 2012. Effect Of Vitrification on Meiotic Maturation and Expression of Genes In Immature Goat Cumulus Oocyte Complexes. *Cryobiology* 64: 176-184.

- Tharasanit T, Colleoni S, Galli C, Colenbrander B, Stout TAE. 2009. Protective Effects Of The Cumulus-Corona Radiata Complex During Vitrification Of Horse Oocyte. *Reproduction* 137: 391-401.
- Wei X, Sijie Y, Weibin Z, Qing X, Jie Z, Xiangdong Z. 2017. Cytoskeleton Genes Expression and Survival Rate Comparison Between Immature and Mature Yak Oocyte After OPS Vitrification. *Animal Biotechnology* 29(4): 247-51
- Widjiati, Boediono A, Sumitro SB, Hinting A, Aulani'am, Susilowati T. 2012. Isolation and Identification of Transforming Growth Factor from *In Vitro* Matured Cumulus Oocyte Complexes. *Hayati* 19(1): 6-10