MAJALAH

KUMPULAN ALIH BAHASA DI BIDANG PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

DISUSUN OLEH :
CECEP SASTRAWILUDIN, S.Pt
PARAMEDIK VETERINER MAHIR

EDISI 12

DESEMBER 2023

MAJALAH

KUMPULAN ALIH BAHASA DI BIDANG PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

EDISI 12

TAHUN 2023

CECEP SASTRAWILUDIN, S.Pt
PARAMEDIK VETERINER MAHIR

DAFTAR ISI

No.	Judul	Halaman
1	Meningkatkan Biosekuriti Produksi Hewan untuk Meminimalkan Risiko One Health Global	1
2	Gen Virulensi dan Biomarker Imunologis untuk Brucellosis pada Domba & Kambing	4
3	Isolasi, Identifikasi dan Spektrum Resistensi Antibakteri Bakteri Patogen Infeksi Saluran Pernafasan pada Peternakan Sapi Skala Besar	15
4	Persiapan Vaksin Polivalen yang Diinaktivasi Terhadap Bakteri Patogen Umum Penyebab Mastitis Sapi dan Evaluasi Potensi Imunisasi dan Terapinya	22
5	Penilaian Fungsi Luteal Menggunakan Palpasi Rektal, Ultrasonografi B-Mode, dan Penentuan Progesteron untuk Meningkatkan Seleksi Penerima dalam Program Transfer Embrio	32
6	Tinjauan: Status penilaian korpus luteum terkini dengan ultrasonografi Doppler untuk mendiagnosis kondisi tidak hamil dan memilih penerima embrio pada sapi	45
7	Dampak Aksesori Corpus Luteum yang Diinduksi oleh *Gonadotropin-Releasing Hormone* atau *Human Chorionic Gonadotropin* terhadap Tingkat Kebuntingan Sapi Perah setelah Transfer Embrio: Analisis META	57
8	Dampak sulitnya transfer embrio terhadap keberhasilannya IVF: tinjauan sistematis dan meta-analisis	70
9	Pentingnya estradiol praovulasi pada penerimaan uterus dan fungsi luteal	79
10	Evaluasi Embrio Sapi Pra-Implantasi—Dari Optik hingga Omics dan Selebihnya	93
11	Perbandingan sapi yang berasal dari fertilisasi in vitro, transfer embrio ovulasi ganda, dan inseminasi buatan untuk produksi susu dan sifat kesuburan	129
12	Perubahan transkriptomik awal pada darah tepi 7 hari pasca transfer embrio pada sapi perah	146
13	Suplemen bioaktif mempengaruhi perkembangan embrio in vitro sapi	156
14	Ekspresi Gen yang Distimulasi Interferon pada Leukosit DarahPerifer sebagai Penanda Prediksi yang Nyaman untuk Status Embrio pada Sapi Hitam Jepang yang Ditransfer Embrio selama Periode Pra-Implantasi	173

Meningkatkan Biosekuriti Produksi Hewan untuk Meminimalkan Risiko One Health Global

Meskipun ada kemajuan luar biasa dalam bidang kedokteran manusia dan hewan selama satu abad terakhir, penyakit menular tetap menjadi penyebab penting kesakitan dan kematian bagi manusia dan hewan di seluruh dunia.[1–4]. Setidaknya 60% penyakit menular yang ada pada manusia dan hingga 75% penyakit baru yang menyerang manusia diperkirakan berasal dari hewan, hal ini menunjukkan bahwa kesehatan hewan dan manusia saling terkait erat.[5].

Perkiraan gabungan beban penyakit zoonosis tertentu pada manusia dan hewan dapat dihitung untuk memberikan bukti nyata mengenai dampak signifikan penyakit zoonosis tertentu pada masyarakat tertentu.[6,7]. Misalnya, Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan kerugian global tahunan akibat penyakit sistiserkosis, yaitu infeksi parasit yang ditularkan melalui konsumsi daging babi yang terinfeksi, melebihi $760.000 USD dalam hal kesehatan manusia dan lebih dari $2 miliar USD dalam hal kerugian ekonomi di produksi ternak[8]. Risiko yang terkait dengan penyebaran penyakit menular dari hewan kemungkinan besar akan meningkat seiring dengan meningkatnya globalisasi dan pergerakan hewan dan produk hewan lintas batas. Praktik yang secara rutin memperhitungkan hasil kesehatan manusia dan hewan (dan lingkungan), yang dikenal sebagai One Health (Gambar 1), sangat penting untuk perbaikan berkelanjutan dalam pengobatan hewan dan manusia di masa depan.

Gambar 1: Payung 'One Health', yang mengakui nasib yang saling terkait manusia, hewan, dan lingkungan hidup (dari[9]).

Ada banyak hal yang perlu dipertimbangkan untuk meminimalkan risiko global One Health, seperti penggunaan antimikroba secara hati-hati, otoritas inspeksi makanan yang kompeten, dan penggunaan vaksin untuk mengurangi dan menghilangkan infeksi-infeksi utama. Bidang perhatian penting lainnya adalah peningkatan biosekuriti yang diterapkan pada produksi hewan. Selain meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan hewan, peningkatan praktik biosekuriti juga akan meningkatkan indeks kesehatan manusia, karena peningkatan stabilitas peternakan, keuntungan yang lebih baik dari barang-barang yang dipasarkan dan ternak, serta peningkatan keamanan pangan, dan juga kesehatan manusia. Program biosekuriti hewan yang terdefinisi dengan baik merupakan bagian dari praktik pertanian berkelanjutan.[10]Karena dampak langsungnya terhadap hasil kesehatan manusia, peningkatan biosekuriti untuk produksi pangan hewani secara langsung menargetkan setidaknya enam dari 17 tujuan pembangunan berkelanjutan PBB (https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/).

Keamanan Hayati – Sebuah Definisi

Dalam konteks ini, biosekuriti mengacu pada praktik dan kebijakan terpadu yang diterapkan pada tingkat nasional, regional atau lokal untuk meminimalkan dan mengelola berbagai ancaman yang mungkin berkontribusi terhadap penyakit atau ketidakhematan pada hewan yang dipelihara untuk dijadikan makanan atau serat. Biosekuriti umumnya mengacu pada menjauhkan agen penular dari operasi hewan atau peternakan, sedangkan biocontainment mengacu pada menjaga agar agen penular tidak ada di peternakan atau di dalam wilayah yang termasuk dalam wilayah tersebut.

Pemahaman yang lebih baik mengenai prinsip-prinsip dasar biosekuriti oleh para peternak dan penerapan prinsip-prinsip tersebut secara lebih konsisten dapat secara signifikan mengurangi beban penyakit zoonosis dan mencegah wabah penyakit hewan di suatu wilayah atau negara. Pemodelan epidemiologi baru-baru ini mengenai pola penularan patogen yang diketahui di seluruh peternakan babi di negara-negara dengan praktik biosekuriti tertentu telah menunjukkan bahwa efisiensi produksi dan kesejahteraan hewan dapat ditingkatkan dengan perhatian yang lebih konsisten terhadap peningkatan praktik biosekuriti.[11]. Lebih lanjut, prinsip biosekuriti dapat digabungkan dengan vaksinasi atau pemberian terapi preventif untuk mengurangi atau memberantas penyakit di suatu wilayah, seperti sistiserkosis pada babi.[6]. Oleh karena itu, program biosekuriti regional yang efektif memerlukan pelatihan bagi produsen dan diseminasi sumber daya pendidikan serta dukungan lokal dan jaringan di luar lokasi agar dapat berkelanjutan.[12]. Dalam situasi yang luas, bantuan kepada petani sering kali dapat dicapai secara efektif melalui organisasi akar rumput atau organisasi sejawat.

Prinsip Dasar Keamanan Hayati dalam Produksi dan Pengelolaan Hewan

Penerapan program biosekuriti di lahan pertanian atau pengelolaan ternak yang efektif tidak harus menjadi upaya yang mahal atau rumit. Beberapa prinsip utama telah terbukti sangat efektif untuk meningkatkan biosekuriti, apapun spesies yang dipertimbangkan, dan prinsip-prinsip ini dibahas secara lebih rinci di bawah ini.[10]. Prinsip-prinsip ini berkaitan dengan pengelolaan akses, pengelolaan hewan, dan pengelolaan operasional. Bahkan dalam situasi pertanian yang terpencil dan luas, prinsip-prinsip dasar biosekuriti dapat diterapkan.

Akses yang terkendali terhadap hewan, melalui penggunaan kandang, kandang, lumbung, dan tempat berlindung lainnya dapat meminimalkan paparan intra dan antarspesies terhadap hewan dan penularan patogen. Mempraktikkan kebersihan yang baik secara rutin, seperti mencuci tangan secara teratur (terutama sebelum makan atau menyiapkan makanan manusia), membersihkan pakaian dan alas kaki yang sangat kotor dengan kotoran hewan, dan membuang atau mengubur kotoran manusia untuk mencegah hewan, seperti babi, bersentuhan atau mengonsumsinya adalah hal yang penting. untuk mengurangi beban biologis dan memutus siklus penularan parasit antara hewan dan manusia. Pengecualian hama dan hama penting untuk mengurangi penularan penyakit

vektor arthropoda dan hewan pengerat, dan karena serangga dan hama dapat menyerang pakan ternak, seperti biji-bijian, dan menurunkan kualitas pakan. Pemisahan fisik antara hewan yang sakit dan yang sehat, serta penanganan dan pemenuhan kebutuhan hewan yang sehat terlebih dahulu akan membantu mengurangi penularan penyakit dalam suatu kelompok hewan. Praktik-praktik ini juga berlaku ketika memasukkan hewan baru ke dalam kawanan atau kawanan ternak. Masa karantina dan stabilisasi dapat membantu untuk memastikan stok baru sehat dan bebas penyakit. Memastikan pakan ternak tidak tercemar dan air bersih serta tidak terkontaminasi akan membantu meminimalkan penyebaran penyakit pada sekelompok hewan. Pembuangan bangkai yang tepat waktu dan tepat merupakan hal yang penting karena pembuangan bangkai yang tidak dikelola dengan baik dapat menyebabkan patogen tetap ada di lingkungan dan juga dapat menarik hama. Demikian pula, kotoran dan kotoran hewan perlu dikelola dengan tepat untuk mengurangi beban patogen. Program yang lebih canggih dapat mencakup rencana tertulis, skema penilaian mandiri, dan pemantauan berkelanjutan.

Banyak contoh pedoman biosekuriti spesifik spesies tersedia untuk membantu petani memahami praktik-praktik ini dan mengembangkan program yang kuat.

Manajemen Risiko Biosekuriti

Meskipun terdapat sensibilitas dalam penerapan praktik biosekuriti yang lebih baik, terdapat resistensi terhadap perubahan praktik pengelolaan dan peternakan tradisional serta kebiasaan dan rutinitas sehari-hari. Hal ini telah menyebabkan wabah penyakit yang spektakuler pada hewan dan manusia, seperti beberapa wabah virus flu burung yang mematikan dan tidak biasa di Tiongkok ketika babi, unggas, dan spesies hewan lainnya dicampur di pasar umum.[4]. Bahkan di negara-negara maju secara ekonomi yang memiliki sistem pengawasan produksi dan standar produksi nasional yang teregulasi, produsen mungkin gagal melihat manfaat dari penerapan praktik biosekuriti yang kuat, sehingga menyebabkan peningkatan risiko terhadap kesehatan manusia dan hewan.[13-15].

Secara tradisional, tanggung jawab pengelolaan, penilaian, dan komunikasi risiko biosekuriti sebagian besar berada di pundak para peternak, dokter hewan, dan kelompok pemasaran terkait, dan program-program ini telah dikelola baik atau buruk di negara mana pun. Hal ini mengakibatkan penerapan praktik yang direkomendasikan tidak konsisten dan kesenjangan dalam program sering kali tidak teridentifikasi hingga terjadi masalah kesehatan, misalnya penularan penyakit.*Enteriditis Salmonella*dalam telur peternakan[16]. Karena semua orang mempunyai kepentingan terhadap kesehatan mereka sendiri serta kesehatan dan kesejahteraan hewan yang dipelihara di sekitar mereka dan karena hewan dan produk sampingan hewan sering kali dikirim dari tempat asal ke tempat yang jauh di seluruh dunia, maka pendekatan terpadu harus dilakukan. diambil untuk manajemen risiko biosekuriti hewan ternak. Hal ini didasarkan pada kekuatan yang mungkin sudah ada dalam pengawasan lokal atau regional.

Antarmuka Keamanan Kesehatan – Pendekatan Terintegrasi

Saling ketergantungan global antar negara dalam bidang pangan menekankan perlunya koordinasi dan pengelolaan biosekuriti pangan hewani yang lebih baik di tingkat nasional dan internasional. OIE (http://www.oie.int/for-the-media/press-releases/detail/ article/ investing-in-biosecurity-a-key-step-to-curb-thespread-of-animal-diseases /), FAO (http://www.fao.org/biosecurity/) dan WHO (http:// www.who.int/influenza/human_ animal_interface/en/) semuanya sangat mendukung perlunya pendekatan terpadu yang lebih baik terhadap biosekuriti manajemen untuk melindungi kesehatan manusia dan hewan. Dengan pendekatan One Health untuk manajemen risiko biosekuriti, penghitungan dan pelaporan risiko biosekuriti di tingkat regional dan nasional akan lebih baik jika ada bantuan dan dukungan. disediakan, sesuai kebutuhan, di tingkat internasional. Manfaat tambahan dari pendekatan terpadu terhadap manajemen risiko biosekuriti mencakup peningkatan pemantauan masalah kesehatan manusia, pembagian informasi yang lebih baik secara nasional ketika masalah biosekuriti muncul, meminimalkan gangguan perdagangan terkait risiko biosekuriti, mengatasi kekhawatiran konsumen mengenai isu biosekuriti hewan dan One Health, dan menyediakan solusi perspektif yang lebih baik untuk mengamati, memantau dan bertindak terhadap penyakit lintas batas pada hewan.[10]

Kesimpulan

Tidak mungkin lagi bagi suatu negara untuk menganggap kesehatan dan perawatan hewan ternak sebagai urusan yang terisolasi dan bersifat pribadi. Meningkatnya kesadaran akan penyakit yang sama antara hewan dan manusia serta pemahaman yang lebih baik tentang patogen bawaan makanan dan pengetahuan tentang sistem distribusi pangan global yang kompleks hanya memperkuat kesenjangan dalam manajemen risiko biosekuriti pangan hewan di seluruh dunia. Untuk mengatasi kesenjangan ini dan untuk memastikan pangan yang lebih aman dan terjamin bagi populasi di seluruh dunia, pemerintah perlu mengadopsi pendekatan yang konsisten, proaktif dan terintegrasi dalam manajemen risiko biosekuriti hewan ternak. Penerapan pendekatan ini akan menghasilkan penilaian risiko biosekuriti, analisis, dan tindakan pencegahan yang lebih baik untuk meningkatkan kehidupan hewan, manusia, dan ekosistemnya.

REFERENSI

1. Anderson BD, Ma MJ, Wang GL, Bi ZQ, Lu B, Wang XJ, Wang CX, Chen SH, Qian YH, Lagu SX, Li M, Zhao T, Wu MN, Borkenhagen LK, CaoWC, Gray GC. Surveilans prospektif terhadap influenza. virus di peternakan babi Tiongkok. Infeksi Mikroba yang Muncul. 2018;7(1):87. doi: 10.1038/s41426-018-0086-1.
2. Khaing TA, Bawm S, Wai SS, Htut Y, Htun LL. Survei epidemiologi sistiserkosis babi di Area Nay Pyi Taw, Myanmar. J Dokter Hewan Med. 2015:340828. doi: 10.1155/2015/340828.
3. Steinmuller N, Demma L, Bender JB, Eidson M, Angulo FJ. Wabah penyakit usus yang berhubungan dengan kontak dengan hewan: bukan lagi sekedar masalah bawaan makanan. Klinik Menginfeksi Dis. 2006;43(12):1596-602.
4. Su S, Bi Y, Wong G, Gray GC, Gao GF, Li S. Epidemiologi, evolusi dan wabah virus flu burung baru-baru ini di Tiongkok. J Virol. 2015; 89:8671-6.
5. Vorou RM, Papavassiliou VG, Tsiodras S. Muncul zoonosis dan infeksi menular vektor yang mempengaruhi manusia di Eropa. Infeksi Epidemiol. 2007;135(8):1231-47.
6. Maurice J. Tentang babi dan manusia – WHO bersiap melawan sistiserkosis. Lanset. 2014; 384:571-2.
7. Torgerson PR, Rüegg S, Devleesschauwer B, Abela-Ridder B, Havelaar AH, Shaw APM, Rushton J, Speybroeck N. zDALY: Indikator yang disesuaikan untuk memperkirakan beban penyakit zoonosis. Satu Kesehatan. 2017;5:40-5. doi: 10.1016/j. onehlt.2017.11.003.
8. SIAPA. Beberapa gambaran tentang penyakit yang terabaikan. http://www. who.int/neglected_diseases/diseases/zoonoses_figures/ en/ (terakhir diakses 11 November 2018).
9. GibbsEPJ. Evolusi One Health: kemajuan dan tantangan selama satu dekade di masa depan. Rek Dokter Hewan. 2014; 174:85–91.
10. FAO. Bagian 1: Prinsip dan komponen biosekuriti. http://www.fao.org/ docrep/pdf/010/a1140e/a1140e01.pdf (terakhir diakses 12 November 2008).
11. Filippitzi ME, Brinch Kruse A, Postma M, Sarrazin S, Maes D, Alban L, Nielsen LR, Dewulf J. Tinjauan jalur penularan 24 penyakit menular yang dapat dicegah dengan tindakan biosekuriti dan perbandingan penerapan langkah-langkah ini pada kawanan babi di enam negara Eropa. Distrik Darurat Lintas Batas. 2018;65(2):381-398. doi: 10.1111/ tbed.12758.
12. Rezaei A. Keamanan pangan: Paradigma kesehatan yang mengutamakan petani. Satu Kesehatan. 2018;5:69-73. doi: 10.1016/j.onehlt.2018.04.001.
13. Kylie J, Brash M, Whiteman A, Tapscott B, Slavia D, Weese

JS, Turner PV. Praktik biosekuriti dan penyebab enteritis di peternakan kelinci daging Ontario. Bisakah Dokter Hewan J. 2017, 58(6):571-8.

14. Compo N, Pearl DL, Tapscott B, Penyimpanan A, Hammermueller J, Kurang ajar M, Turner PV. Praktik biosekuriti di peternakan dan penyebab kematian sebelum penyapihan pada peralatan cerpelai komersial Kanada. Pemindaian Dokter Hewan Acta. 2017; 59(1):57. doi: 10.1186/s13028- 017-0326-8.
15. Graham JP, Leibler JH, Harga LB, Otte JM, Pfeiffer DU, Tiensin T, Silbergeld EK. Hubungan hewan-manusia dan penyakit menular dalam industri produksi pangan hewani: memikirkan kembali biosekuriti dan biocontainment. Perwakilan Kesehatan Masyarakat 2008; 123(3):282-99.
16. Trampel DW, Pemegang TG, Gast RK. Manajemen peternakan terpadu untuk mencegah kontaminasi Salmonella Enteriditis pada telur. J Appl Poultr Res. 2014; 23:353-65.

Patricia V.Turner,

Patricia V. Turner, MS, DVM, DVSc, DACLAM, DABT, DECAWBM (AWSEL) adalah Presiden Terpilih Asosiasi Kedokteran Hewan Dunia dan Ketua Kelompok Kerja Kesejahteraan Hewan dan Pendidikan Kedokteran Hewan WVA Kelompok kerja. Dia tinggal di Kanada dan bekerja dalam kapasitas global mengawasi kebijakan kesejahteraan hewan dan manajemen risiko di Charles River.

Surel: patricia.turner@crl.com

Artikel Penelitian

Gen Virulensi dan Biomarker Imunologis untuk Brucellosis pada Domba & Kambing

AsmAAIKLANArwish*, ADeIM. eaku-KAttAn, Mpada suatuSayaAhmouD, MohAmeDT. RAgAb, Alaki-lakiAh Afez

Departemen Kesehatan Hewan dan Unggas, Divisi Hewan dan Unggas, Pusat Penelitian Gurun, Kairo, Mesir.

Abstrak | *Brucella melitensis* merupakan masalah yang menjengkelkan bagi para peternak hewan. Ia menyerang berbagai hewan ternak yang menyebabkan kemandulan, aborsi, dan lahir mati. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kesamaan gen yang berkaitan dengan *B.melitensis* virulensi strain lapangan dan menilai perubahan profil imunologis, hormonal, dan zat besi yang terkait dengannya *B.melitensis* infeksi pada domba dan kambing dengan referensi khusus pada nilainya sebagai biomarker penyakit. Usap vagina dikumpulkan dari 110 ekor domba betina dan 150 ekor domba betina untuk pemeriksaan bakteriologis. Sampel darah dikumpulkan untuk estimasi profil imunologi, hormonal, dan zat besi. Pemulihan total dari *B.melitensis* adalah 13,50% dengan persentase yang hampir sama pada domba (13,60%), dan kambing (13,33%). *B.melitensis* yang dimiliki oleh isolat *bvfA* gen, *virusB* gen, dan *kamu* gen dengan persentase masing-masing 62,8%, 77%, dan 37%. *B.melitensis* infeksi pada domba dan kambing menghasilkan peningkatan yang signifikan (P<0,05) pada sitokin pro-inflamasi, protein fase akut (APP), radikal bebas, kortisol, hormon pertumbuhan, dan konsentrasi TSH dan penurunan yang signifikan (P<0,05) pada sitokin anti-inflamasi, anti-oksidan, kadar insulin, T3, dan T4. Profil besi hewan yang terinfeksi ditandai dengan hipoferremia, hiperferritinemia, dan hipotransferrinemia yang signifikan (P<0,05). Perkiraan sitokin dan APP pro-inflamasi menghasilkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi pada kedua spesies yang terinfeksi, namun IL-1β, IL-6, dan Fb memiliki rasio kemungkinan tertinggi pada domba yang terinfeksi dan IL-1β dan IL-1α memiliki rasio kemungkinan tertinggi pada domba yang terinfeksi. rasio pada kambing yang terinfeksi sementara Hp dan IL-1β mencetak persentase peningkatan tertinggi di antara penanda-penanda ini. Kami menyimpulkan bahwa *bvfA, virB,* Dan *kamu* adalah gen virulensi utama di dalamnya *B.melitensis* isolat yang diperoleh dari usapan vagina domba dan kambing yang terinfeksi. *B.melitensis* Infeksi menimbulkan respons imun bawaan yang menonjol pada domba dan kambing, yang mengakibatkan beberapa perubahan profil hormonal dan zat besi. IL-1β, IL-6, Fb, dan Hp adalah penanda yang baik

untuk brucellosis domba, dan IL-1β, IL-1α, dan Hp merupakan indikator yang baik untuk brucellosis kambing.

Kata kunci | *Brucella melitensis*; gen virulensi; Perubahan imunologis; Perubahan hormonal; Profil besi.

diterima | 03 Maret 2023; **Diterima** | 05 April 2023; **Diterbitkan** | 01 Mei 2023

*** korespondensi** | Asmaa A Darwish, Departemen Kesehatan Hewan dan Unggas, Divisi Hewan dan Unggas, Pusat Penelitian Gurun, Kairo, Mesir; **Surel:** asmaa_vet25@yahoo.com

kutipan | Darwish AA, M.El-Kattan A, Mahmoud MA, Ragab MT, Hafez AA (2023). Gen virulensi dan biomarker imunologi untuk brucellosis pada domba & kambing. J.Anim. Produk Kesehatan. 11(2): 165-175.

lakukan saya | http://dx.doi.org/10.17582/journal.jahp/2023/11.2.165.175

ISSn | 2308-2801

hak cipta: 2023 oleh penulis. Penerima Lisensi ResearchLinks Ltd, Inggris, Inggris.
Artikel ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan lisensi Creative Commons Attribution (CC BY) (https://creativecommons. org/lisensi/oleh/4.0/).

Perkenalan

Lpeternakan sapi, khususnya peternakan domba dan kambing, merupakan sumber pendapatan yang signifikan bagi masyarakat yang tinggal di pantai utara Mesir. Namun, Brucellosis masih menjadi tantangan besar bagi peternak domba dan kambing di Mesir dan negara-negara produsen lainnya. Penyakit ini diketahui menyebabkan kemandulan, aborsi, dan lahir mati pada berbagai spesies hewan, dan hal ini juga menimbulkan risiko kesehatan yang signifikan bagi manusia di negara-negara berkembang seperti Mesir (Nayel dkk., 2020; Akhtar dkk., 2021). Mengontrol Brucellosis adalah tugas yang menantang, karena bakteri telah mengembangkan beberapa mekanisme untuk menghindari sistem kekebalan tubuh, khususnya makrofag. Oleh karena itu, menganalisis jalur molekuler yang digunakan Brucella untuk bertahan hidup di dalam sel inang sangat penting dalam mengembangkan strategi efektif untuk mengendalikan dan mencegah Brucellosis.

(Mohamed dkk., 2008).

Brucella dibagi menjadi enam spesies berdasarkan hewan inangnya. Di Mesir, *B.melitensis* adalah spesies paling umum pada manusia dan hewan diikuti oleh *B.abortus* Dan *B.suis* (Abdel-Hamid dkk., 2020). Semua anggota Brucella berkerabat dekat satu sama lain, dan patogenisitasnya bergantung pada faktor virulensi (Gandara dkk., 2001). Elemen gen terkait virulensi yang paling umum pada Brucella adalah faktor virulensi Brucella A (*bvfA*), *VirB*, dan gen urease (*kamu*). *BvfA* prihatin dengan kemampuan Brucella untuk tetap hidup di inangnya. Ini adalah protein periplasma kecil 11 kDa yang unik untuk genus Brucella (Lavigne dkk., 2005). Ini mungkin membantu dalam menyiapkan ceruk intraseluler (Lavigne dkk., 2005;Mohamed dkk., 2008). *VirB* protein adalah faktor virulensi Brucella lainnya. Mereka adalah 12 protein yang bertanggung jawab untuk membentuk sistem sekresi tipe IV (T4SS) sehingga memfasilitasi replikasi intraseluler Brucella dan keluar dari sistem kekebalan tubuh inang (Delrue dkk., 2004). Gen urease (*kamu*) merupakan faktor virulensi yang membantu Brucella bertahan hidup in-vivo dan in-vitro pada pH rendah. Meskipun Brucella memiliki dua kelompok gen urease yang berbeda (*ure1* Dan *ure2*), *ure1* hanya mengkode urease aktif dan tidak ada yang mengetahui perannya *ure2* dalam biologi Brucella (Felix dkk., 2010).

Respon imun merupakan reaksi tubuh terhadap serangan patogen. Banyak molekul protein yang terlibat dalam respon imun, namun yang mendominasi adalah sitokin inflamasi. Mereka adalah penyelenggara utama respon imun. Mereka adalah inisiator, pembesar, dan terminator respon imun (Demirdag dkk., 2003; Hashem dkk., 2020). Mereka diklasifikasikan menjadi: sitokin pro-inflamasi yang merangsang sel-sel kekebalan lain untuk memulai fungsinya dan berkoordinasi di antara mereka dan sitokin imun anti-inflamasi yang menghambat dan mencegah eksaserbasi peradangan. Di bawah rangsangannya, hepatosit mensintesis sekelompok globulin α dan β, yang disebut protein fase akut (APPs) (Shalby dkk., 2020). Selama infeksi, mereka mencoba membatasi pertumbuhan mikroba dan menjaga homeostatis tubuh inang sampai antibodi terbentuk. Radikal bebas, sistem komplemen, dan imunoglobulin juga diaktifkan di bawah pengaruh sitokin pro-inflamasi. Sitokin dan APP pro-inflamasi diperkenalkan sebagai indikator kesehatan kelompok dan penanda sensitif untuk berbagai kondisi patologis dan keganasan (El-Boshy dkk., 2009).

Mengingat fakta-fakta tersebut, penelitian kali ini dilakukan untuk mencari dan mengetahui gen umum yang terkait dengan virulensi *B.melitensis* strain lapangan diambil dari domba dan kambing di pantai Barat Laut Mesir dan menilai beberapa perubahan profil imunologi, hormonal, dan zat besi terkait dengan *B.melitensis* infeksi dengan referensi khusus pada sitokin pro-inflamasi dan validitas APP sebagai penanda diagnostik dan prediktor penyakit di dua spesies.

Bahan dan metode

Animals

Setelah mendapat persetujuan etis dari Departemen Kesehatan Hewan dan Unggas, Divisi Kesehatan Hewan dan Unggas, DRC, Kairo, Mesir, penelitian ini dilakukan pada 260 hewan (110 ekor domba betina (3-5 tahun) dan 150 ekor betina (3-5 tahun)) dengan riwayat aborsi baru-baru ini, dikumpulkan secara acak dari berbagai wilayah di pantai utara Mesir.

Bpemeriksaan akteriologi

Sampel: Usap vagina dikumpulkan dari semua hewan pada media transportasi Stuart untuk isolasi bakteri dan deteksi molekuler. Penyeka diangkut dalam kondisi dingin ke laboratorium bakteriologi pusat penelitian gurun dan disimpan pada suhu -20 °C hingga diproses.

Isolasi Brucella: Semua sampel bakteriologis diproses di bawah Keamanan Hayati tingkat dua (BSL2) dengan perlindungan pribadi yang tinggi seperti yang dijelaskan (OIE, 2009).

Sekitar 1 ml isinya, ditumbuhkan pada media agar triptosa dengan suplemen antibiotik selektif (Ewalt dkk., 1983) (Oksoid). Berdasarkan Alton dkk (1988), plate dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 37°C dengan 10% CO2 dan diperiksa pertumbuhannya setiap hari selama 15 hari. Isolat diidentifikasi sebagai Brucella.

Koloni yang diduga Brucella menunjukkan ciri-ciri bulat, mengkilat, tepi utuh, runcing, dan berwarna madu jika terkena cahaya (Alton dkk., 1988;OIE, 2016).

Identifikasi isolat: Isolat tersebut terlebih dahulu diidentifikasi melalui uji morfologi, urease, dan oksidase (OIE 2018;Saavedra dkk., 2019). Isolat khas koloni halus, coccobacilli Gram-negatif, urease-, dan oksidase-positif diidentifikasi sebagai Brucella spp, dan disimpan pada suhu –18 °C dalam Kaldu Kedelai Tryptone (Oxoid CM0129) yang ditambah dengan 10% gliserin.

persiapan DNA: Ekstraksi DNA dari sampel dilakukan menggunakan kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Germany, GmbH) dengan modifikasi dari rekomendasi pabrikan. Secara singkat, 200 µl suspensi sampel diinkubasi dengan 10 µl proteinase K dan 200 µl buffer lisis pada suhu 56OC selama 10 menit. Setelah inkubasi, 200 µl etanol 100% ditambahkan ke dalam lisat. Sampel kemudian dicuci dan disentrifugasi mengikuti rekomendasi pabrik. Asam nukleat dielusi dengan 100 µl buffer elusi yang disediakan dalam kit.

Tabel 1: Urutan primer, gen target, ukuran amplikon, dan kondisi siklus untuk PCR konvensional.

target gen	Urutan primer	Saya-disederhanakan segmen (bp)	Utama dena-turasi	Amplifikasi (35 siklus)			Terakhir perpanjangan	referensi
				Sekunder denatura-tion	anil	Perpanjangan		
B. meliten-kakak IS711	AAATCG-CGTCCTTGCTG-GTCTGA TGCCGATCACTTAA-GGGCCTTCAT	731	94˚C 5 menit.	94˚C 30 detik.	54˚C 40 detik.	72˚C 45 detik.	72˚C 10 menit	Gupta dkk Al. (2014) Akhtar, , dkk pada tahun 2021
BvfA	ACCCTTCGTCGAT-GTGCTGA	1282	94˚C 5 menit.	94˚C 1 menit.	65˚C 1 menit.	72˚C 1,3 menit.	72˚C 10 menit.	Derakh Shandeh dkk al., 2013
	CCGCGCTGAT-TTCATCGCTG							
virusB	CGCTGATCTATAAT-TAAGGCTA	881	94˚C 5 menit.	94˚C 30 detik.	54˚C 40 detik.	72˚C 45 detik.	72˚C 10 menit.	
	TGCGACTGCCTCC TATCGTC							
kamu	GCTTGCCCTTGAAT-TCCTTTGTGG	2100	94˚C 5 menit.	94˚C 1 menit.	65˚C 1 menit.	72˚C 1,3 menit.	72˚C 10 menit.	
	ATCTGCGAATTTGC-CGGACTCTAT							

PolimerAseChainRtindakan e(PCr)

PCR tradisional digunakan untuk memperkuat gen virulensi Brucella spp. *BvfA, VirB,* Dan *kamu* diamplifikasi dengan bantuan primer oligonukleotida spesifik, Metabion (Jerman) (Tabel 1).

Primer digunakan dalam reaksi 25 µl yang memiliki 12,5 µl Emerald Amp Max PCR Master Mix (Takara, Jepang), 1 µl masing-masing primer pada konsentrasi 20 pmol, 5,5 µl air, dan 5 µl templat DNA, reaksi dilakukan dalam thermal cycler biosystem 2720 terapan.

AnAlisis dariPcr Psaluran

Elektroforesis pada gel agarosa 1,5% (Applichem, Germany, GmbH) dalam 1x buffer TBE pada suhu kamar dengan gradien 5V/cm digunakan untuk memisahkan produk PCR. Di setiap slot gel, 20 µl produk PCR multipleks dimasukkan untuk analisis gel. ukuran fragmen ditentukan dengan menggunakan penggaris gen tangga 100 bp (Fermentas, Jerman), tangga DNA 100 bp H3 RTU (Genedirex), dan pilot gel 100 bp plus tangga (Qiagen, Gmbh, Jerman) Dokumentasi gel sistem (Alpha Innotech atau Biometra) mengambil gambar gel, dan perangkat lunak komputer digunakan untuk melihat datanya.

SayaimunologiAl,hormonAl,estimasi parameter profil besi dan besi

Darah sebanyak 5 ml dikumpulkan dari anglutathione peroxidase (GPx) yang terinfeksi Brucella, hewan glutathione reduktase (15 ekor domba betina dan 20 ekor sapi betina yang positif mengidap penyakit tersebut. pemeriksaan bakteriologis dan dianggap sebagai kelompok sakit (DG)) dan dari hewan yang tampak sehat (Kelompok kontrol (CG); 15 ekor domba betina dan 20 ekor betina dengan suhu tubuh, pernafasan dan detak jantung dalam rentang normal, tidak ada aborsi dan hasil pemeriksaan bakteriologis negatif), dan dipisahkan menjadi dua tabung. Tabung pertama berisi heparin (5000 IU) untuk menghentikan proses koagulasi sedangkan tabung kedua polos dan darah dibiarkan menggumpal. Kedua sampel disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan plasma dan serum yang diheparinisasi. Plasma dan serum yang diheparinisasi disimpan di Eppendorf bersih pada suhu -80 dan kemudian digunakan untuk menentukan parameter profil imunologi, hormonal, dan zat besi.

Sitokin pro-inflamasi serum (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α) dan sitokin anti-inflamasi (IL-10) diperkirakan menggunakan kit ELISA (MyBioSource Company, San Diego, USA). Fibrinogen plasma (Fb), serum amiloid A (SAA) dan serum haptoglobin (Hp) diukur menggunakan kit ELISA komersial dari IBL International Crop (Canda). Serum caeruloplasmin (Cp) dan serum transferrin (Tf) dideteksi dengan metode turbidimetri menggunakan kit yang dibeli dari perusahaan komersial (Elab Science USA), dan serum ferritin dievaluasi dengan metode Chemiluminescence immunoassay (CLIA) menggunakan kit yang diperoleh dari Abnova (Taipei, Taiwan).

Konsentrasi serum radikal bebas (malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO)), antioksidan (katalase (CAT), glutathione reduktase (GR)), besi serum (SI), dan kapasitas pengikatan besi total (TIBC) ditentukan secara spektrofotometri menggunakan peralatan komersial dari perusahaan Biodiagnostic (Giza, Mesir).

Tes hormonal serum (kortisol, insulin, TSH, T3, T4, dan hormon pertumbuhan (GH)) diperkirakan dengan metode CLIA menggunakan kit yang disediakan oleh DiaSorin (Saluggia Italia).

Semua instruksi manual diikuti dengan cermat.
- Persen saturasi transferrin (TF sat.%) = SI/TIBC*100.
- Kapasitas pengikatan besi tak jenuh (UIBC) = TIBC-SI.

SAnalisis Statistik

Nilai rata-rata CG dan DG dari spesies yang sama dibandingkan dengan uji T sampel independen menggunakan SPSS®program versi 23. Perbedaan dianggap signifikan pada P<0,05.

Program Graph pad prisma versi 8 digunakan untuk mengevaluasi area di bawah kurva (AUC), titik potong, sensitivitas, spesifisitas, dan rasio kemungkinan (LR) untuk sitokin dan APP yang diukur antara DG dan CG pada spesies yang sama.

Nilai prediksi positif (PPV), nilai prediksi negatif (NPV), dan tingkat akurasi dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$PPV = True\ positive \div Total\ positive \times 100.$$

$$NPV = True\ negative \div Total\ negative \times 100.$$

$$Accuracy\ rate = (True\ positive + True\ negative) \div Total\ population \times 100.$$

$$\begin{aligned} Percentages\ of\ increaese\ or\ decrease\ for\ all\ parameters \\ &= (The\ mean\ value\ of\ the\ marker\ concentration\ in\ DG \\ &- The\ mean\ value\ of\ its\ concentration\ in\ CG) \\ &\div The\ mean\ value\ of\ its\ concentration\ in\ CG \times 100. \end{aligned}$$

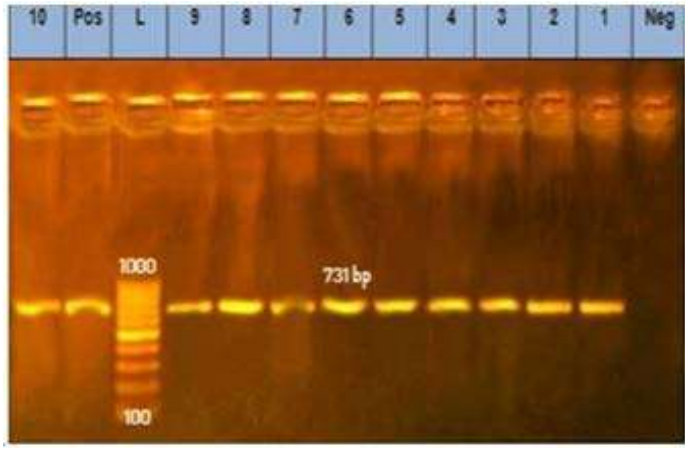
HASIL

Sayasolasi dan identifikasi *B.melitensis*

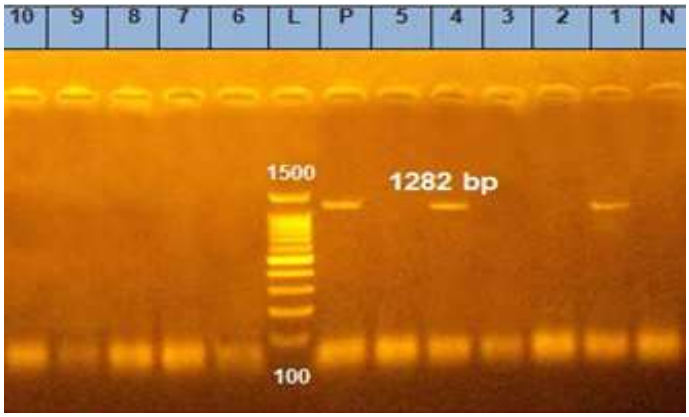
Organisme Brucella diperoleh dari 35 dari 260 usapan vagina (13,50%) dengan persentase yang hampir sama pada domba dan kambing (15/110 domba (13,60%), dan 20/150 kambing (13,33%)). Kultur Brucella menunjukkan ciri khas genus Brucella. Koloni berbentuk bulat, berkilau, halus, runcing, dengan batas utuh, permukaan cemerlang, dan berwarna madu jika terkena cahaya, coccobacilli Gram-negatif, dengan uji oksidase dan urease positif.

MKARAKTERISASI OLEKULER

Tes Pcr: Universal PCR dalam penelitian ini mengkonfirmasi keberadaan materi genetik suatu genus*Brucella*di semua 35 (100%) ekstrak DNA dari mana*Brucella melitensis*telah terisolasi dari budaya mereka. Pengujian ini telah diperkuat gen target (*B.melitensis*- IS711) dengan amplifikasi fragmen 731 bp (Gambar 1) karakteristik Genus*Brucella melitensis*, gen virulensi*bvfA*,*virusB*, Dan *kamu*pengujian gen dihasilkan pada amplikon masing-masing 1282, 881, dan 2100 bp (Gambar 2,3,4).



Gambar 1: Produk PCR amplifikasi gen IS711 Jalur 1-10 : B. melitensis, jalur Pos. jalur kendali positif Neg: kendali negatif. Jalur L: penanda molekuler (100bp-1000bp). Semua jalur positif.



Gambar 2: Agarosa gel elektroforesis menunjukkan fragmen yang diamplifikasi sebesar 1282bp*B. melitensis bvfA* gen. Jalur L: penanda molekuler (100bp-1500bp), jalur N: kontrol negatif, dan jalur 1 dan 4: positif*B. melitensis bvfA*gen dan jalur 2, 3, 5, dan 6-10: negatif untuk*B. melitensis bvfA* gen.

PCruntuk gen virulensi

62,8% (22/35) dari isolat yang dibawa*bvfA*gen (Gambar 2), *virusB*gen tercatat pada 77% (27/35) isolat (Gambar 3), *kamu*gen terdeteksi pada 37% (13/35) isolat (Gambar 4).

SayaimunologiAl,hormonAl,Hasil Profil besi dan besi

Meja 2)membersihkan itu*B.melitensis*Infeksi pada domba dan kambing dikaitkan dengan respon imun bawaan yang kuat

Meja 2: Perbandingan antara sitokin, protein fase akut, status oksidan-antioksidan, uji hormonal dan profil zat besi pada kelompok sakit dan kelompok kontrol dari kedua spesies. nilai= rata-rata ±SD.

Parameter	Domba		Kambing	
	cG	dG	cG	dG
IL-1α (Pg/ml)	31,59±4,10	89,60±6,86*	31,37±2,62	84,90±4,33*
AKU-1β (Hal/ml)	28,24±4,34	132,10±9,74*	24,92±2,01	130,20±7,82*
IL-6 (Pg/ml)	29,88±1,98	65,56±2,78*	26,91±2,24	64,98±2,05*
TNF-α (Pg/ml)	27,22±2,97	75,90±4,58*	26,60±1,62	72,86±2,42*
IL-10 (Pg/ml)	102,50±4,04	75,76±8,81*	100,57±2,70	71,63±6,18*
Facebook (mg/dl)	127,75±15,33	248,15±14,46*	103,70±3,96	194,90±10,69*
Cp (mg/dl)	3,39±0,83	7,48±0,35*	3,40±0,84	7,48±0,35*
HP (g/dl)	0,15±0,02	3,12±0,53*	0,13±0,01	2,68±0,29*
SAA (mg/L)	2,76±0,26	6,76±0,64*	2,34±0,32	6,39±0,48*
MDA (nmol/ml)	13,27±0,99	20,94±2,11*	12,50±0,22	19,70±2,09*
TIDAK (μmol/L)	25,66±1,26	40,40±2,11*	22.08±1.60	39,14±2,42*
KUCING (U/L)	464,80±30,22	292,20±7,92*	414,01±27,80	288,35±5,60*
GPx (mU/L)	1065±22,42	792,80±15,71*	955,50±30,32	760,60±39,36*
GR (ng/ml)	21,90±0,91	12,36±0,58*	21,35±1,04	12,30±0,55*
Kortisol (μg/dl)	1,76±0,13	7,01±0,41*	1,30±0,06	6,90±0,25*
Insulin (μIU/ml)	8,69±0,28	7,18±0,24*	8,10±0,28	7,06±0,18*
T3(ng/ml)	1,82±0,12	1,03±0,04*	1,72±0,06	1,01±0,04*
T4 (μg/ml)	0,81±0,06	0,70±0,05*	0,78±0,08	0,65±0,03*
TSH (μIU/ml)	0,010±0,002	0,028±0,007*	0,011±0,002	0,028±0,007*
GH (ng/dl)	12,28±1,41	17,26±0,80*	11,82±0,88	17,18±0,70*
SI (μg/dl)	104,89±2,07	94,71±1,78*	103,14±2,02	92,56±1,93*
TIBC (μg/dl)	263,17±21,48	378,04±11,75*	213,17±21,49	328,04±11,75*
UIBC (μg/dl)	158,28±21,26	283,34±11,76*	110,03±21,76	235,48±12,62*
Transferin (mg/dl)	126,30±2,75	85,60±2,39*	124,45±3,25	81,60±3,28*
Jika duduk. %	40,11±3,35	25,07±0,92*	48,87±5,21	28,26±1,43*
Feritin (ng/ml)	15,85±1,34	23,60±1,54*	15,25±1,12	22,40±1,54*

Perbedaan nilai yang signifikan antara kelompok sakit dan kelompok kontrol dari spesies yang sama ditunjukkan dengan (*) pada P<0,05.

IL-1α: interleukin 1 alpha, IL-1β: interleukin 1 beta, IL-6: interleukin 6, TNF-α: tumor necrosis alpha, IL-10: interleukin 10, Fb: fibrinogen, Cp: caeruloplasmin, Hp: haptoglobin, SAA: serum amiloid A, MDA: malondialdehyde, NO: oksida nitrat, CAT: katalase, GPx: glutathione peroksidase, GR: glutathione reduktase, TSH: hormon perangsang tiroid, GH: hormon pertumbuhan, SI: besi serum, TIBC: kapasitas besi total , UIBC: kapasitas pengikatan besi tak jenuh, Tf sat. %: saturasi transferin%.

CG: kelompok kontrol, DG: kelompok sakit.

tabel 3: Titik potong,% sensitivitas, spesifisitas%, rasio kemungkinan (LR),% PPV, NPV%, tingkat akurasi (AR) dan persentase kenaikan (+) atau penurunan (-) dari perkiraan sitokin proinflamasi (IL-1α) , IL-1β, IL-6, TNF-α) dan protein fase akut (Fb, Cp, Hp, SAA, transferrin, ferritin) pada DG dibandingkan dengan CG (dari spesies yang sama).

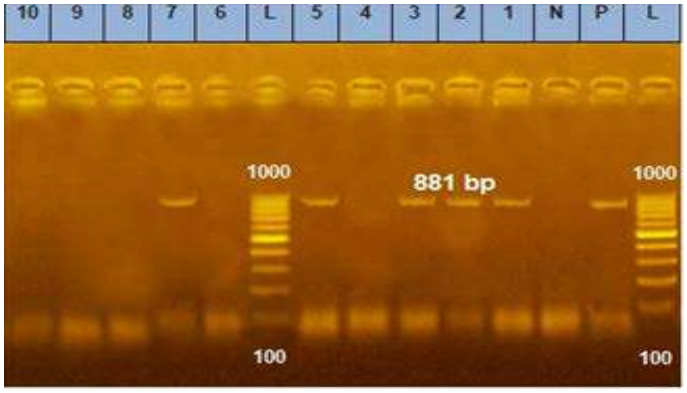
Parameter	Jenis	memotong	Kepekaan	Kekhususan	lr	PPV	nPV	Ar	% dari (+,-)
IL-1α (Pg/ml)	Domba	37.11	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	183,63%
	Kambing	30.35	100%	95%	20	95,24%	100%	97,50%	170,64%
IL-1β (Pg/ml)	Domba	37.63	100%	95%	20	95,24%	100%	97,50%	367,77%
	Kambing	29.44	100%	95%	20	95,24%	100%	97,50%	422,47%
IL-6 (Pg/ml)	Domba	32.66	100%	95%	20	95,24%	100%	97,50%	119,41%
	Kambing	30.11	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	141,47%

TNF-α (Pg/ml)	Domba	31.00	100%	85%	6.67	86,96%	100%	92,50%	178,84%
	Kambing	28.73	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	173,91%
Facebook (mg/dl)	Domba	144,50	100%	95%	20	95,24%	100%	97,50%	94,25%
	Kambing	109	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	87,95%
Cp (mg/dl)	Domba	4.40	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	120,64%
	Kambing	4.40	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	120%
HP (g/dl)	Domba	0,1850	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	1980%
	Kambing	0,1450	100%	80%	5	83,33%	100%	90%	1961,54%
SAA (mg/L)	Domba	2.96	100%	80%	5	83,33%	100%	90%	144,93%
	Kambing	2.84	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	173,08%
Transferin (mg/dl)	Domba	123.00	100%	90%	10	90,91%	100%	95%	- 32,22%
	Kambing	121.00	100%	75%	4	80%	100%	87,50%	- 34,43%
Feritin (ng/ml)	Domba	17.50	100%	85%	6.67	86,96%	100%	92,50%	48,90%
	Kambing	16.50	100%	85%	6.67	86,96%	100%	92,50%	46,89%

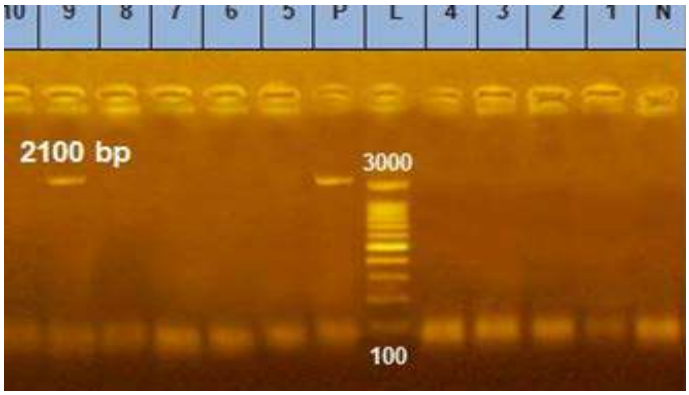
LR= 0,5-5: rendah; LR=5-10: sedang; LR>10: tinggi.
IL-1α: interleukin 1 alpha, IL-1β: interleukin 1 beta, IL-6: interleukin 6, TNF-α: tumor necrosis alpha, IL-10: interleukin 10, Fb: fibrinogen, Cp: caeruloplasmin, Hp: haptoglobin, SAA: serum amiloid A.

ditunjukkan oleh peningkatan yang signifikan (P˂0,05) dalam konsentrasi sitokin pro-inflamasi (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α), APPs (Fb, Cp, Hp, SAA), radikal bebas (MDA, NO), dan penurunan yang signifikan (P˂0,05) pada kadar sitokin anti-inflamasi (IL-10) dan anti-oksidan (CAT,GPx,GR) pada DG dibandingkan dengan CG. Secara paralel, peningkatan signifikan (P˂0,05) pada konsentrasi kortisol, GH, dan TSH, sementara kadar insulin, T3, dan T4 menurun secara signifikan (P˂0,05) pada DG dibandingkan dengan CG. Profil besi kedua spesies menunjukkan hipoferremia, hiperferritinemia, hipotransferrinemia yang signifikan (P˂0,05), peningkatan TIBC, UIBC, dan penurunan Tf sat.% pada DG jika dibandingkan dengan CG.

Mengenai nilai diagnostik dari perkiraan sitokin pro-inflamasi dan APP,Tabel (3)mengklarifikasi bahwa semua menghasilkan nilai sensitivitas, spesifisitas, PPV, NPV, dan AR yang tinggi serta LR sedang hingga tinggi pada kedua spesies, (kecuali SAA pada domba dan Hp dan Tf pada kambing). Mengurutkannya berdasarkan LR, IL-1β, IL-6, Fb adalah penanda terbaik untuk brucellosis domba (LR=20) diikuti oleh IL-1α, Cp, Hp, Tf (LR=10), kemudian feritin, TNF-α , SAA dengan LR masing-masing sebesar 6,67, 6,67 dan 5. Di sisi lain, IL-1β, IL-1α adalah indikator terbaik untuk caprine brucellosis (LR=20) diikuti oleh IL-6, TNF-α, Fb, Cp, SAA (LR=10) kemudian ferritin, Hp, Tf dengan LR masing-masing 6,67, 5, 4. Sedangkan persentase kenaikannya sangat merekomendasikan Hp sebagai penanda terbaik brucellosis pada kedua spesies, diikuti oleh IL-1β.



Gambar 3: Elektroforesis gel agarosa menunjukkan fragmen teramplifikasi sebesar 881bp*B. melitensis virB* gen. Jalur L : penanda molekuler (100bp-1000bp), jalur N : kontrol negatif dan jalur 1,2,3, 5 dan 7 : positif*B. melitensis virB*gen dan jalur 4, 6, 8,9,10: negatif*B. melitensis virB*gen.



Gambar 4: Elektroforesis gel agarosa menunjukkan fragmen teramplifikasi sebesar 2100bp*B.melitensis ure*gen.Lajur L:penanda molekuler (100bp-3000bp), jalur P kontrol positif, jalur N: kontrol negatif dan jalur 9: positif*B. melitensis ure* gen dan Jalur 1-8, dan 10 negatif*B. melitensis ure*gen.

diskusi

Brucella adalah coccobacillus intraseluler fakultatif gram negatif, ia memiliki kemampuan unik untuk beradaptasi dengan kondisi yang ditemukannya di dalam sel inang. Ia berubah seiring waktu untuk menghindari dan mengelabui sistem kekebalan tubuh dengan mengganggu perdagangan intraseluler, melawan ledakan pernapasan, dan beradaptasi dengan kekurangan oksigen di dalam makrofag (Mohamed dkk., 2008;El-Boshy dkk., 2009). Tingkat pemulihan total*B.melitensis*dalam penelitian kami adalah 13,5% (35/260) dengan persentase yang hampir sama pada kedua spesies, yaitu 13,60% (15/110) pada domba dan 13,33% (20/150) pada kambing. Tingkat pemulihan serupa *B.melitensis*diperoleh sebelumnya dari sampel susu dan usap vagina yang dikumpulkan dari kambing di Yordania (Samadi dkk., 2010), eksudat vagina kambing di Meksiko (Herrera dkk., 2011), dan usapan vagina, limpa, dan cairan rahim dari kambing di Semenanjung Malaysia (Bamaiyi dkk., 2012). Persentase lebih tinggi dari*B.melitensis*ditemukan dari sampel susu sapi di Irak oleh Esmail (2019)sebesar 18%, sampel susu di Mesir sebesar 18%.Aman dkk. (2020)sebesar 21,5%, susu kambing dan domba sebesar 35% dan usap vagina sebesar 62,5% di Iran sebesar Shakerian dkk. (2016), dan persentase yang lebih rendah diperoleh dari kambing yang diaborsi di Etiopia yaitu sebesar 7,8%.Tekle dkk. (2019). Variasi dalam kejadian infeksi berkaitan dengan sifat spesies Brucella yang rewel, stadium penyakit, jumlah bakteri yang keluar melalui sekret, perjalanan penyakit, lokalitas, laju paparan, status reproduksi, perbaikan diagnostik. teknik, strategi vaksinasi dan penegakan kebijakan pemberantasan nasional (Nada dkk., 1992;Luna-Martinez dan Mejia-Teran, 2002).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar *B.melitensis* isolat mempunyai gen faktor virulensi (*bvfA, virB,*Dan *kamu*) dalam genom mereka. Kami menemukan bahwa 62,8% dari*B. melitensis*yang dimiliki oleh isolat*bvfA*gen, persentase ini serupa dengan persentase yang dilaporkan olehLavigne dkk. (2005)dan lebih rendah dari persentase yang dicatat olehDerakhshandeh dkk. (2013),Hamdy dan Zaki (2018), DanAman dkk. (2020)siapa yang menemukan *bvfA*gen di*B.melitensis*diisolasi dari domba, kambing, dan sapi di Mesir dengan persentase masing-masing 78,5%, 92,3%, dan 79%. Mereka menghubungkan tingginya prevalensi ini dengan virulensi*bvfA*gen di*B.melitensis*isolat terhadap potensi virulensi bakteri ini dan perannya *bvfA*dalam replikasi Brucella intraseluler.

Dalam penyelidikan ini, 77% dari*B.melitensis*yang dimiliki oleh isolat *virusB* gen.Derakhshandeh dkk. (2013)DanAman dkk. (2020) persentase tercatat*virusB*gen yang dekat dengan kita masing-masing sebesar 73,8% dan 74%.*B.melitensis*pulih dari janin domba dan kambing yang diaborsi di Iran dan susu mentah di Mesir. Di samping itu,Hamdy dan Zaki (2018)ditemukan*virusB* gen di 96,2% dari*B.melitensis*diisolasi dari berbagai sampel domba, kambing, dan sapi di Mesir. Ketika,Esmail (2019)diperoleh*virusB*gen hanya pada 37,5% dari*B.melitensis* pulih dari susu sapi di Irak.*VirB*gen yang dikodekan untuk T4SS Brucella, yang merupakan faktor utama dalam virulensi Brucella. Ia menyembunyikan Brucella dari sistem kekebalan tubuh inang dan membuatnya tetap hidup di dalam sel dan memfasilitasi replikasi intraselulernya (Delrue dkk., 2004;den Hartigh dkk., 2008; Saeedzadeh dkk., 2012). 37% dari*B.melitensis*isolat dalam penelitian ini miliki*kamu*gen, persentase ini jauh lebih rendah dibandingkanDerakhshandeh dkk. (2013),Aman dkk. (2020), Dan Abdel-Hamid dkk. (2020)siapa yang menemukan*kamu*gen di 88%, 88%, dan 91,7% dari*B.melitensis*terisolasi. Perbedaan hasil ini*kamu*gen mungkin disebabkan oleh perbedaan sumber, jumlah sampel, dan area yang diteliti.*kamu*Gen memiliki peran penting dalam kelangsungan hidup mikroba, ia memecah urea menjadi karbon dioksida dan amonia untuk membuat lingkungan di sekitarnya lebih basa dan memudahkan sel untuk hidup di lingkungan asam (Seleem dkk., 2008;Bandara dkk., 2007).

Interaksi antara tuan rumah dan*B.melitensis*organisme dalam penelitian ini berhasil membangkitkan respon imun bawaan yang menonjol pada kedua spesies yang terinfeksi. Hal ini ditunjukkan oleh peningkatan konsentrasi sitokin pro-inflamasi (IL-1α, IL-1β, IL-6,TNF-α) yang luar biasa pada domba dan betina yang sakit. Hasil ini bertepatan dengan Demirdag dkk. (2003), dan Hashem dkk. (2020) yang mencatat peningkatan aktivitas TNF-α, IL-1β, dan IL-6 pada brucellosis manusia, sapi, dan domba. Sitokin pro-inflamasi adalah pemicu utama respon imun inflamasi. Mereka didefinisikan sebagai glikoprotein kecil, yang dilepaskan secara nonspesifik dari berbagai sel kekebalan selama berbagai jenis infeksi, terutama infeksi bakteri. Mereka mengoordinasikan fungsi sel kekebalan lainnya untuk memulai dan memperburuk respon imun inflamasi. IL-1β dan TNF-α, merupakan sitokin proinflamasi terpenting selama infeksi Brucella. Karena IL-1β mempengaruhi ekspresi faktor adhesi pada sel endotel untuk memfasilitasi migrasi leukosit (pembunuh patogen) ke tempat infeksi (Nicklin dkk., 2000). Sedangkan TNF-α sangat penting untuk membunuh Brucella secara optimal oleh makrofag. TNF-α juga meningkatkan produksi IFN-γ, yang menstimulasi pembentukan makrofag dengan aktivitas membunuh Brucella intraseluler yang kuat (Seder dan Hill, 2000;Murphy dkk., 2001). Selain itu, respons sel T yang diinduksi IFN-γ secara luas berpartisipasi dalam imunitas terhadap intraseluler*B.abortus*(Saunders dkk., 2000).

Berbeda dengan hasil kami,El-Boshy dkk. (2009)melaporkan penurunan kadar TNF-α, IFN-γ, dan IL-1α serta perubahan konsentrasi IL-6 yang tidak signifikan pada unta yang terinfeksi Brucella. Dia menghubungkan hasil ini dengan peningkatan konsentrasi IL-10 yang dia peroleh. Karena peningkatan peroksidasi lipid yang biasanya terjadi pada brucellosis, mendorong transkripsi IL-10. IL-10 memiliki-

karakter ti-inflamasi dan sangat menurunkan regulasi aksi sitokin pro-inflamasi. Ini juga menekan kapasitas presentasi antigen dari sel penyaji antigen. Dengan demikian, IL-10 membantu Brucella melepaskan diri dari mekanisme kekebalan protektif inangnya. Selain itu, ditemukan bahwa netralisasi IL-10 in-vivo dengan antibodi monoklonal anti-IL-10 menyebabkan jumlah bakteri lebih sedikit (hingga 10 kali lipat) pada tikus yang terinfeksi virus mematikan. *B.abortus*tekanan (Fernandes dan Baldwin, 1995). Logikanya, penurunan tingkat IL-10 yang nyata pada kelompok penyakit dari kedua spesies di sini, menjelaskan peningkatan respon imun inflamasi dalam penelitian ini.

Selanjutnya, peningkatan nyata dalam konsentrasi protein fase akut (Fb, Cp, Hp, SAA) tercatat pada kedua spesies yang terinfeksi dalam penelitian ini. APP adalah jenis imunitas non-spesifik bawaan lainnya. Mereka disintesis oleh hepatosit dan dilepaskan dalam darah tepi, di bawah pengaruh sitokin proinflamasi teraktivasi yang disebutkan di atas dalam berbagai kondisi patologis. Mereka juga terlibat dalam beberapa kondisi fisiologis seperti kehamilan dan persalinan. Umumnya, mereka bertugas menjaga hemostasis dan membatasi pertumbuhan mikroba hingga produksi antibodi. Berdasarkan konsentrasinya dalam darah selama infeksi, APP diklasifikasikan menjadi APP positif (biasanya meningkat selama infeksi) dan APP negatif (biasanya menurun selama infeksi). Mereka disarankan sebagai biomarker yang dapat diandalkan untuk berbagai penyakit pada hewan dan manusia. Mereka dipengaruhi oleh spesies, jenis kelamin dan usia. APR adalah temuan umum pada brucellosis pada spesies yang berbeda, hal ini sebelumnya diindikasikan pada manusia dengan peningkatan kadar CRP dan Fb (Uluğ dkk., 2010), pada sapi dengan peningkatan konsentrasi SAA dan Hp (Syarifiyazdia dkk., 2012), dilakukan dengan meningkatkan nilai protein reaktif C (Mahboub dkk., 2013), pada unta karena hiperhaptoglobinemia (Hamdy dkk., 2019) dan pada domba karena hiperfibrinogenemia (Shalby dkk., 2020).

Produk lain untuk aktivasi sitokin pro-inflamasi dalam pekerjaan ini adalah pembentukan radikal bebas (MDA dan NO). Radikal bebas adalah atom tidak stabil yang mencuri elektron dari tetangganya untuk mencapai stabilitas kimianya. Dengan demikian, mereka mengubah tetangganya menjadi radikal bebas dan serangkaian reaksi oksidatif dimulai. Pada dasarnya, mereka memiliki sifat antimikroba yang kuat melalui oksidasi komponen patogen. Mereka diproduksi dari makrofag dan neutrofil inang sebagai respons terhadap sitokin proinflamasi yang bersirkulasi sebagai bagian dari kekebalan bawaan mereka. Dalam kondisi normal, mereka dikontrol secara efisien oleh anti-oksidan. Sayangnya, penipisan anti-oksidan (CAT, GPx, GR) dalam laporan ini mengacu pada produksi radikal bebas secara besar-besaran yang kemudian menyebabkan habisnya anti-oksidan. Oleh karena itu, radikal bebas mulai menyerang sel-sel tubuh yang berbeda dan menyebabkan kerusakan organ yang parah dan stres oksidatif muncul. Dalam aspek ini, banyak peneliti mengkonfirmasi kontribusi besar stres oksidatif terhadap patogenesis brucellosis pada spesies hewan yang berbeda (Kataria dkk., 2010;Bozukluhan dkk., 2017;Merhan dkk., 2017; Shalby dkk., 2020).

Tidak hanya komponen kekebalan yang dipengaruhi oleh aktivasi sitokin pro-inflamasi tersebut di atas, tetapi juga sistem endokrin. Investigasi sebelumnya menyoroti dampak besar sistem kekebalan terhadap sistem endokrin. Ketika sitokin pro-inflamasi yang diperkuat, terutama IL-1β dan TNF-α, menginduksi kelenjar hipofisis anterior untuk mengeluarkan lebih banyak hormon ACTH yang merangsang sekresi glukokortikoid dari kelenjar adrenal (Gentilini dkk., 2015; Gentilini dkk., 2019). Sesuai dengan teori ini, hiperkortisolemia nyata diamati pada domba dan kambing yang sakit dalam penelitian ini. Selanjutnya, penurunan kadar insulin, T3, dan T4 serta peningkatan konsentrasi hormon pertumbuhan terdeteksi pada hewan yang terinfeksi Brucella. Karena kortisol menghambat sekresi insulin dengan mengganggu metabolisme Zn dan sinyal insulin, menyebabkan disfungsi tiroid parsial dan meningkatkan produksi dan sekresi hormon pertumbuhan (Stratakis dkk., 2006;Morais dkk., 2019;Cai dkk., 2020). Tindakan ini terutama untuk membalikkan hipoglikemia yang biasanya terjadi pada brucellosis (Hashem dkk., 2020). Sementara itu, sedikit peningkatan yang diamati pada konsentrasi TSH pada hewan yang sakit, mungkin disebabkan oleh respons hipofisis terhadap penurunan kadar T3 dan T4.

Menariknya, profil zat besi pada hewan yang sakit dalam penelitian ini juga merupakan cerminan dari aktivasi sitokin pro-inflamasi yang dijelaskan di atas. Sitokin pro-inflamasi membatasi kemampuan patogen untuk mendapatkan zat besi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan penggandaannya melalui beberapa mekanisme. Seperti induksi anoreksia, penghambatan penyerapan zat besi di usus, peningkatan pembentukan feritin, peningkatan sintesis hepsidin, dan penurunan transferin (Arica dkk., 2012;Ganz dkk., 2015;Ganz, 2018;Salem dkk., 2020). Oleh karena itu, banyak hipoferemia, hiperferritinemia, dan hipotransferenemia diperoleh pada kedua spesies yang sakit di sini. Sejalan dengan hipoferemia, TIBC dan UIBC meningkat tajam dan Tf sat. % menurun. Respon fase akut, yang umumnya terlihat pada brucellosis, mungkin menjadi penyebab lain perubahan ini karena feritin adalah reaktan fase akut positif dan transferin adalah reaktan fase akut negatif (Arica dkk., 2012;Salem dkk., 2020).

Mengenai pentingnya perkiraan sitokin pro-inflamasi dan APP sebagai biomarker untuk brucellosis, semuanya mencapai sensitivitas, spesifisitas, PPV, NPV, dan AR yang tinggi dan LR sedang hingga tinggi (kecuali SAA pada domba dan Hp dan Tf pada kambing). Penanda terbaik diantaranya adalah IL-1β, IL-6, dan Fb untuk ovine brucellosis dan IL-1β

dan IL-1α untuk brucellosis caprine. Perhitungan persentase kenaikan penanda ini, dengan kuat menominasikan Hp sebagai indikator terbaik untuk penyakit pada kedua spesies dan didukung dengan penggunaan IL-1β sebagai indikator brucellosis pada kedua spesies. Hasil ini sejalan dengan pendapat sebelumnya, menyarankan sitokin pro-inflamasi dan APPs sebagai biomarker sensitif untuk brucellosis pada spesies yang berbeda dan tidak setuju dengan keunggulan penanda dalam diagnosis penyakit (Demirdag dkk., 2003;El-Boshy dkk., 2009;Uluğ dkk., 2010;Syarifiyazdia dkk., 2012; Mahboub dkk., 2013;Hamdy dkk., 2019; Hashem dkk., 2020; Salem dkk., 2020; Shalby dkk., 2020). Variasi ini mungkin disebabkan oleh stadium penyakit, spesies Brucella, spesies inang, distribusi geografis, dan sistem pemberian makan.

kesimpulan

Penelitian tersebut mengkonfirmasi keberadaan*Brucella melitensis*pada usap vagina domba dan kambing dan menghubungkan virulensinya dengan kehadiran*bvfA, virB,*Dan*kamu*gen virulensi.*B.melitensis* memunculkan respons imun bawaan yang menonjol pada domba dan kambing yang berkontribusi besar terhadap perubahan profil hormonal dan zat besi yang terkait dengan penyakit ini. Mengetahui perubahan ini mungkin berguna dalam memodifikasi protokol pengobatan yang mendukung penyakit. IL-1β, IL-6, Fb, dan Hp merupakan penanda yang baik untuk ovine brucellosis sedangkan IL-1β, IL-1α, dan Hp merupakan indikator yang baik untuk caprine brucellosis.

PengakuanPengetahuanDGMEntS

Penulis berterima kasih kepada anggota Departemen Kesehatan Hewan dan Unggas, Pusat Penelitian Gurun, Kairo, Mesir.

konflik kepentingan

Penulis tidak memiliki konflik kepentingan.

PERNYATAAN BARU

Penelitian ini menyelidiki gen virulensi pada*B.melitensis*isolat yang diperoleh dari usap vagina domba dan kambing dan perubahan profil imunologi, hormonal, dan zat besi yang paling penting terkait dengan infeksinya. Penelitian ini juga menyarankan penanda baru untuk brucellosis pada kedua spesies.

KONTRIBUSI PENULIS

Semua penulis berkontribusi sama.

referensi

diisolasi dari manusia dan ternak di wilayah geografis berbeda di Pakistan menggunakan MLVA-15. Dokter hewan. medis. Sains. 7.5 (2021): 1688-1695.

Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988). Teknik laboratorium brucellosis. edisi ke-1. INRA. Paris.

Aman I., AL-Hawary I., Helmy N., EL-Gushi A. (2020). Deteksi organisme Brucella dari susu mentah Mesir menggunakan teknik budaya dan molekuler. Dokter Hewan Kafrelsheikh. medis. J., 18(2): 14-19.

Arica V, Şilfeler İ, Arica S, Tutanç M, Motor VK, İnci M (2012). Brucellosis dengan kadar feritin sangat tinggi: laporan lima kasus. Bersenandung. Contoh. beracun. 31(1):104-6.https://doi.org/ 10.1177/0960327111414281. Epub 2011 27 Juni. PMID: 21708883.

Abdel-Hamid NH, El-bauomy EM, Ghobashy HM, Shehata A A. (2020). Variasi genetik isolat Brucella pada tingkat strain di Mesir. Dokter hewan. medis. Sains, 6(3): 421–432.

Bamaiyi PH, Hassan L, Khairani-Bejo S, Zainal Abidin M, Ramlan M, Krishnan N, Adzhar A, Abdullah N, Hamidah N HM, Norsuhanna MM, Hashim SN (2012). Isolasi dan karakterisasi molekuler*Brucella melitensis*dari kambing seropositif di Semenanjung Malaysia. Trop. Bioma. 29(4):513-8. PMID: 23202595.

Bandara AB, Contreras A., Contreras-Rodriguez A., Martins AM, Dobrean V., Poff-Reichow S., Rajasekaran P., Sriranganathan N., Schurig GG, Boyle SM (2007). *Brucella suis*urease yang dikodekan oleh ure1 tetapi bukan ure2 diperlukan untuk infeksi usus tikus BALB/c. Mikrobiol BMC. 7:57.https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-57.

Bozukluhan K, Merhan O, Celebi O, Buyuk F, Ogun M, Gokce G.(2018). Kadar parameter biokimia dan stres oksidatif tertentu pada sapi penderita Brucellosis. Jurnal Hellenic Vet.Med. Masyarakat., 68(3): 285–290.https://doi.org/ 10.12681/jhvms.15470

Cai R, Zhou W, Jiang L, Jiang Y, Su T, Zhang C, Zhou W, Ning G, Wang W (2020). Hubungan antara fungsi tiroid dan kortisol serum pada pasien adenoma penghasil kortisol. Kelenjar endokrin. 69(1):196-203.https://doi.org/10.1007/ s12020- 020-02278-5. Epub 2020 14 April. PMID: 32291738.

Delrue RS, Lestrate L, Tibor A, Letesson JJ, Bolle XD (2004). Patogenesis Brucella, gen diidentifikasi dari layar acak berskala besar. Mikrobiol FEMS. Biarkan. 231:1-12

Demirdağ, K, Ozden M, Kalkan A, Godekmerdan A, Kilic S (2003). Tingkat sitokin serum pada pasien dengan brucellosis akut dan hubungannya dengan penanda inflamasi tradisional. Imunol FEMS. medis. Mikrobiol. 39: 149-53. den Hartigh AB, Rolan HG, de Jong MF, Tsoli RM (2008). VirB3-VirB6 dan VirB8-VirB11, tetapi bukan VirB7, penting untuk memediasi persistensi Brucella dalam sistem retikuloendotelial. J. Bakteriol. 190: 4427-4436.

Derakhshandeh A., Firouzi R., Goudarztalejerd A. (2013). Deteksi gen virulensi (bvfA, virB dan ure) pada*Brucella melitensis*diisolasi dari janin domba dan kambing yang diaborsi. Iran J. Mikrobiol., 5(4): 402.

El-Boshy M., Abbas H, El-Khodery S, Osman S. (2009). Respon sitokin dan temuan klinisopatologis pada unta yang terinfeksi Brucella (*Camelus dromedarius*). Dokter hewan. Med., 54: (1): 25–32.

Esmail JR (2019). Identifikasi molekuler dari*Brucella gagal* dan gen virulensinya (bvfA, virB, dan ure) pada manusia dan ternak yang terinfeksi dari provinsi Al-Diwaniyah, Irak. Ann. Trop. medis. Kesehatan., 22: 21-32.

Ewalt DR, Packer RA, Harris SK (1983). Peningkatan media selektif untuk mengisolasi Brucella sp. dari susu sapi, hal. 577–589 Dalam Prosiding Simposium Internasional Ketiga Asosiasi Dokter Hewan Diagnostik Laboratorium Dunia Fakultas Kedokteran Hewan, Iowa State University, Ames, IA [Google Cendekia]

Felix JS, Ana MC, Asuncion S, Juan MG (2010).*Brucella gagal* wilayah ure2 mengandung transporter urea yang diaktifkan asam dan sistem transportasi nikel. Mikrobiol BMC. 10:107.

Fernandes DM, Baldwin CL (1995). Interleukin-10 menurunkan regulasi kekebalan protektif terhadap*Brucella gagal*. Menulari. Imun., 63: 1130–1133.

Gandara B., Merino AL, Rogel MA, Martinez-Romero E. (2001). Keterbatasan keragaman genetik Brucella spp. J.Klin. Mikrobiol. 39: 235-240.

Ganz T, Nemeth E (2015). Homeostasis besi dalam pertahanan tuan rumah dan peradangan. Nat Rev Imunol. Agustus 2015;15(8):500-10. doi: 10.1038/nri3863. Epub 2015 10 Juli. PMID: 26160612; PMCID: PMC4801113.

Ganz T (2018). Besi dan infeksi. Int. J.Hematol. 107:7–15 https://doi.org/10.1007/s12185-017-2366-2.

Gentilini MV, Velásquez LN, Barrionuevo P, Arriola Benitez PC, Giambartolomei GH, Delpino MV (2015). Steroid adrenal memodulasi respon imun selama*Brucella gagal* infeksi melalui mekanisme yang bergantung pada regulasi produksi sitokin. Menginfeksi Imun. 83(5):1973-82. doi: 10.1128/IAI.03090-14. Epub 2015 2 Maret. PMID: 25733519; PMCID: PMC4399066.

MV Gentilini, Giambartolomei GH, MV Delpino (2019). Steroid Adrenal Memodulasi Respon Sinoviosit Seperti Fibroblast Selama*B.abortus*Infeksi. Depan. Endokrinol. 10:722.https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00722. Gupta

VK, Shivasranappa N., Vijay Kumar, Ashok Kumar. (2014). Evaluasi diagnostik uji serologis dan PCR berbasis gen yang berbeda untuk mendeteksi*Brucella melitensis* di kambing. Rumin Kecil. Res. 117(1):94-102.

Hamdy M, Khoudair RM, Ibrahim MA, Shalby NA, El-Shafei, AA, Abo El-Maaty AM, Abd El Hameed AR dan, Mohamed RH. Protein Fase Akut (APP) dan Kadar Mineral yang Berhubungan dengan Brucellosis pada Unta. animasi. Res Kesehatan. J.Vol. 7, No.4, November 2019 hlm.732-741.

Hashem MA, El-Mandrawy SA, El-Diasty MM, Zidan AZ (2020). Studi Hematologi, Biokimia dan Imunologi tentang Brucellosis pada Sapi dan Domba di Kegubernuran Dakahlia dan Damietta, Mesir. Zag Dokter Hewan. J., 48 (1): 23-35, Maret 2020.

Herrera E, Rivera A, Palomares EG, Hernández-Castro R, Díaz-Aparicio E (2011). Isolasi dari*Brucella melitensis*dari kambing seronegatif yang divaksinasi RB51. Trop. animasi. Produk Kesehatan. 43(6):1069-70.https://doi.org/10.1007/s11250-011-9822-4. Epub 2011 1 April. PMID: 21455694.

Kataria N, Kataria A, Maan R, Gahlot AK (2010). Evaluasi stres oksidatif pada sapi yang terinfeksi brucella. J. Stres Fisiol. Biokimia., 6 (2): 19-25 ISSN 1997-0838.

Lavigne JP, Patey G, Sangari FJ, Bourg G, Ramuz M (2005). O'Callaghan D, dkk. Identifikasi faktor virulensi baru, BvfA, di*Brucella suis*. Menulari. kekebalan. 73:5524-5529.

Luna-Martinez JE, C.Mejia-Teran, (2002). Brucellosis di Meksiko: Status dan tren saat ini. Dokter hewan. Mikrobiol., 90:19-30.

Mahboub HD, Helal MA, Abd Eldaim MA, Abd El-Razek EM, Elsify AM (2013). Seroprevalensi Agen Penyebab Aborsi pada Ras Domba dan Kambing Mesir dan Pengaruhnya terhadap Kinerja Hewan. J. Pertanian. Sains. 5(9) ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760. Diterbitkan oleh Pusat Sains dan Pendidikan Kanada

Merhan O, Bozukluhan K, Kuru M, Büyük F, Özden Ö, Kükürt A (2017). Investigasi Indeks stres oksidatif dan profil lipid pada sapi dengan Brucellosis. Kafkas Univ Dokter Hewan Fak Derg, 23 (6): 933-937.https://dx.doi.org/10.9775/kvfd.2017.18004.

Mohamed NS, Stephen MB, Nammalwar S (2008). Brucella: Apatogen tanpa gen virulensi klasik. Dokter hewan. Mikrobiol. 129: 1-14

Morais JBS, Severo JS, Beserra JB, de Oiveira ARS, Cruz KJC, de Sousa Melo SR, do Nascimento GVR, de Macedo GFS, do Nascimento Marreiro D (2019). Hubungan Antara Kortisol, Resistensi Insulin dan Seng pada Obesitas: Tinjauan Mini. biologi. Jejak Elemen. Res. Oktober;191(2):323-330.https://dx.doi.org/10.1007/s12011-018-1629-y.Epub 2019 7 Januari. PMID: 30617901.

Murphy EA, Sathiyaseelan J., Orangtua MA, Zou B., Baldwin CL (2001). Interferon-gamma sangat penting untuk bertahan hidup a *Brucella gagal*Infeksi pada tikus C57BL/6 yang resisten dan tikus BALB/c yang rentan. Imunologi., 103: 511–518. Nada AR, SI Shalaby, WM Ahmed (1992). Mineral dan elemen jejak profil darah hewan yang terinfeksi Brucella, hamil dan tidak hamil. Mesir J. Komp. jalan. Klinik. Pathol., 1,5: 2-2.

Nayel M, Ibrahim R, Zaghawa A, Abd El- Maksoud A, Elsify A, Salama A , Kamr A, Mousa W, Eldesoukey I, Shaker A (2020). Seroprevalensi dan Faktor Risiko Terkait Brucellosis pada Domba, Kambing dan Unta di Wilayah Pesisir Barat Laut Mesir. J.Kur. Dokter hewan. Res., 2(1): 25-34.https://dx.doi.org/10.21608/JCVR.2020.90220.

Nicklin MJ, Hughes DE, Barton JL, Ure JM, Duff GW (2000). Peradangan arteri pada tikus yang kekurangan gen antagonis reseptor interleukin 1. J.Percobaan. Kedokteran, 191: 303– 312.

(OIE). (2009) Kantor Internasional des Epizooties Bovine Brucellosis; brucellosis caprine dan ovine dan brucellosis babi. Dalam: Majelis Delegasi Dunia OIE bab 2.4.3. Paris: Pedoman Terestrial OIE; P. 1–35.

OIE. (2016) Brucellosis (*Brucella abortus, B.melitensis*Dan *B.suis*), Bab 2.1.4. Manual Tes Diagnostik dan Vaksin Hewan Terestrial. Kantor Internasional des Epizooties, Paris.

OIE (2018). Organisasi Dunia untuk Kesehatan Hewan. Brucellosis (infeksi dengan*B. abortus, B. melitensis*Dan*B.suis*). Dalam: OIE. Panduan uji diagnostik dan vaksin untuk hewan darat. Paris;. P. 355-98.

Saavedra MJ, Fernandes C, Queiroga C (2019). Laboratorium diagnosis brucellosis. Di dalam: Simomes JCC, Saavedra MJ,Hunter PA, editor. Brucellosis pada kambing dan domba: Zoonosis lama yang endemik dan muncul kembali di abad ke-21. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2019. hal. 15180. Saeedzadeh A., Sharifiyazdi H., Firouzi R. (2012) Molekuler. karakterisasi dari*Brucella melitensis*Strain Rev.1 pada domba dan kambing yang diaborsi di Iran. Komp. Klinik. jalan. 22: 409-412. Salem A, Ayady E , Amran Y , Alhasanat M (2020). Serum Tinggi Ferritin sebagai Biomarker Sensitif untuk Mendiagnosis, Menindaklanjuti dan Responsif Penatalaksanaan Brucellosis. J.Med. Sains. Klinik. Res. 8(7): 99-102.https://dx.doi.org/10.18535/jmscr/v8i7.20

Samadi A, Ababneh MMK, Giadinis ND, Lafi SQ (2010). Yg berhubung dgn domba dan caprine Brucellosis (*B.melitensis*) pada hewan yang diaborsi pada kawanan domba dan kambing Yordania. Dokter hewan. medis. Int.https://doi. org/10.4061/2010_458_695.

Saunders BM, Liu Z., Zhan Y., Cheers C. (1993). Interleukin-6 produksi selama infeksi eksperimental kronis. imunol. Biol Sel., 71: 275–280.

Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM (2000). Interleukin-6 menginduksi produksi interferon gamma dini pada paru-paru yang terinfeksi tetapi tidak diperlukan untuk menghasilkan kekebalan spesifik terhadap infeksi Mycobacterium tuberkulosis. Menulari. Imun., 68, 3322–3326.

Seder RA, Bukit AV (2000). Vaksin terhadap intraseluler infeksi yang memerlukan imunitas seluler. Alam, 17, 793–798. Seleem, MN, Stephen, MB dan Nammalwar, S.2008. Brucella: Patogen tanpa gen virulensi klasik. Dokter hewan. Mikrobiol. 129, 1-14.

Shakerian A, Deo P, Rahimi E, Shahjavan A, Khamesipour F (2016). Deteksi molekuler Brucella melitensis pada susu domba dan kambing di Iran. Trop. J. Farmasi. Res. 15 (5): 913-918.http://www.tjpr.orghttp://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i5.3.

Shalby NA, Abo El-maaty AM, Ali AH, El gioushy M (2020). Biomarker fase akut, oksidan, dan mineral dari kawanan domba bergerak yang secara alami terinfeksi brucellosis. Bulgaria J. Dokter Hewan. Kedokteran, ISSN 1311-1477;https://dx.doi. org/10.15547/bjvm.2020-0002.

Sharifiyazdia H, Nazifi S, Nikseresht K, Shahriari R (2012). Evaluasi Serum Amiloid A dan Haptoglobin pada Sapi Perah yang Terinfeksi Brucellosis Secara Alami. J. Bakteriol. Parasitol 3:157.https://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.1000157.

Stratakis CA (2006). Kortisol dan hormon pertumbuhan: klinis implikasi dari hubungan yang kompleks dan dinamis. Endokrinol Pediatr. Pdt. Apr;3 Tambahan 2:333-8. PMID: 16675933. Tekle M., Legesse M., Edao BM dkk. (2019). Isolasi dan identifikasi Brucella melitensis menggunakan alat bakteriologis dan molekuler dari kambing yang diaborsi di wilayah Afar di timur laut Ethiopia. Mikrobiol BMC. 19:108 (2019). https://doi.org/10.1186/s12866-019-1474-y

Uluğ M, Can-Uluğ N, Selek Ş (2010). Tingkatan Fase Akut Reaktan pada Penderita Brucellosis Akut. Klimik Dergisi 23(2): 48-50.

Pakistan J. Zool., jilid. 56(1), hal 33-39, 2024 **DOI**: https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20230311140332

Isolasi, Identifikasi dan Spektrum Resistensi Antibakteri Bakteri Patogen Infeksi Saluran Pernafasan pada Peternakan Sapi Skala Besar

Yunxia Guo[1], Xia Zhou[1]*, Xin Huang[2]dan Fagang Zhong[2]

[1]*Sekolah Tinggi Ilmu dan Teknologi Peternakan, Universitas Shihezi, Shihezi 832003, Cina.*
[2]*Laboratorium Kunci Negara untuk Peningkatan Genetik Domba dan Pembiakan Sehat, Akademi Ilmu Reklamasi Pertanian Xinjiang, Shihezi 832000, Tiongkok.*

Informasi Artikel
Diterima 11 Maret 2023
Direvisi 25 April 2023
Diterima 12 Mei 2023
Tersedia online 21 Juli 2023 (akses awal)
Diterbitkan 01 Desember 2023

Kontribusi Penulis
YG mengumpulkan data eksperimen. XZ menyusun proyek penelitian. XH dan FZ membantu dalam analisis data, serta penulisan naskah.

Kata-kata kunci
Infeksi saluran pernafasan, Antimikroba, Kerentanan, Sapi, Pneumonia

ABSTRAK

Penelitian saat ini bertujuan untuk melaporkan bakteri patogen dan spektrum resistensi antibakterinya yang menyebabkan infeksi saluran pernapasan sapi di peternakan sapi skala besar. Usap nasofaring dikumpulkan dari hewan (n=122) yang memiliki manifestasi klinis penyakit saluran pernapasan. Prosedur kultur standar diikuti dengan uji difusi cakram Kirby-Bauer diterapkan untuk menghitung profil resistensi antimikroba dari isolat bakteri. Hasil survei menunjukkan bahwa bronkitis dan bronkopneumonia merupakan penyakit pernafasan yang umum terjadi pada sapi. Insiden organisme bakteri tertinggi *Stafilokokus aureus* (83,6%), diikuti oleh *Streptococcus pneumoniae* (80,3%) dan *Klebsiella pneumoniae* (77,0%) dicatat dalam sampel saluran pernafasan. *Pasteurella multocida, Bacillus obstruktifus* Dan *Mycoplasma alkalescens* menunjukkan resistensi 100% terhadap penisilin, sementara *Bacillus subtili* Dan *M.alkalescens* menunjukkan resistensi 100% terhadap tetrasiklin. *Mycoplasma dispar, B. subtilis, M. alkalescens, B. obstruktifus,* Dan *stah. aureus* melawan sefoksitin; Dan *M.alkalescens,* Dan *Mikrokus luteus* terhadap cefoperazone menunjukkan resistensi ≥90%. Secara keseluruhan, sebagian besar isolat bakteri menunjukkan resistensi ≥70% terhadap banyak antimikroba. Profil spektrum antimikroba menunjukkan situasi yang mengkhawatirkan bagi badan pengawas untuk mengurangi penggunaan agen antimikroba yang tidak bersifat hukum.

PERKENALAN

Tiongkok menyumbang sekitar 3,8% produksi susu mentah dunia, dengan perkiraan volume sebesar 32 juta ton pada tahun 2019. Sapi perah menghadapi banyak patogen menular yang terkait dengan berbagai sistem tubuh seperti pernapasan, pencernaan, urogenital, dll. (Silva dan Bittar, 2019). Infeksi saluran pernafasan menyumbang 6% dari total infeksi global (Ghimire *dkk.*, 2022). Peningkatan penyakit pernafasan telah dilaporkan pada musim dingin; sementara faktor lain yang berkontribusi adalah tempat tidur yang tidak higienis, pencemaran lingkungan, malnutrisi dan masalah manajemen (Kumar *dkk.*, 2014).

Sejumlah agen infeksius diketahui sebagai agen etiologi penyakit pernapasan, termasuk bakteri, virus, ragi, dan protozoa. Infeksi bakteri lebih sering terjadi dibandingkan dengan infeksi lain; namun, hal ini mempengaruhi kelompok populasi yang lebih kecil (Carvajal dan Perez, 2020). Diperkirakan mikrobioma normal pada saluran pernafasan seperti *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* dll., dapat terlibat dalam infeksi saluran pernapasan (Prat dan Lacoma, 2016). *Mannhemia haemolytica, Pasteurella multocida*, Dan *Histophilus somni* diisolasi sebagai patogen umum infeksi saluran pernapasan sapi (Berunding, 2009). Meskipun demikian, patogen ini berada di lubang hidung dan nasofaring (saluran pernapasan bagian atas) pada sapi yang sehat, dan menjadi oportunistik ketika pertahanan inangnya terganggu (Timsit *dkk.*, 2013). *Mycoplasma dispar, Mycoplasma bovis* Dan *Mycoplasma bovirhinis* diisolasi dari ternak yang sakit juga (Jumat, 1980). Koinfeksi dari banyak bakteri patogen ini bersama dengan virus potensial dapat berkontribusi terhadap penyakit pernapasan sapi (BOvine Respiratory Disease/BRD), salah satu penyakit paling mematikan pada industri peternakan secara global (Gaudino *dkk.*, 2022).

* Penulis koresponden: xzhou88@yahoo.com
0030-9923/2024/0001-0033 $9.00/0

Hak Cipta 2024 oleh penulis. Masyarakat Zoologi Penerima Lisensi Pakistan.
Artikel ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan lisensi Creative Commons Attribution (CC BY) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Sejak awal tanggal 21st abad ini, masalah resistensi antimikroba semakin hari semakin mengkhawatirkan. Penelitian telah menunjukkan hubungan antara penggunaan antibiotik dan prevalensi resistensi pada organisme mikroba (kucing *dkk.*, 2016;Donaldson *dkk.*, 2006). Data dari peternakan penghasil pangan menunjukkan bahwa banyak peternak menggunakan dosis antimikroba yang menyimpang dibandingkan dosis yang tertera pada brosur (Timmerman *dkk*., 2006), yang berpotensi mengubah mikrobiota menjadi serangga (Dewulf *dkk.*, 2007).

Banyak variasi profil resistensi antimikroba Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae dan bakteri patogen lainnya telah diamati antara kelompok sapi yang berbeda (Tikofsky *dkk.*, 2003;kucing *dkk.*, 2005;Bokma *dkk.*, 2020;Haley *dkk.*, 2020). Hal ini berpotensi mencerminkan penggunaan antimikroba di area tertentu, dan mungkin mengingatkan berbagai pemangku kepentingan mengenai relevansi klinis resistensi antibiotik. Tujuan dari penyelidikan saat ini adalah untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan mengeksplorasi spektrum resistensi antibakteri dari isolat bakteri patogen saluran pernafasan sapi di peternakan sapi skala besar.

BAHAN DAN METODE

Persetujuan studi

Tata letak penelitian didiskusikan dengan manajer peternakan dan persetujuan resmi diperoleh sebelum dimulainya pengumpulan sampel. Sampel dikumpulkan dengan bantuan dokter hewan di peternakan dan diagnosis penyakit juga dilakukan melalui diskusi panel yang terdiri dari seluruh dokter hewan. Persetujuan institusional diperoleh dari Komite Etika Hewan Universitas Shihezi (Persetujuan No. A2022-14403).

Desain studi dan pengambilan sampel

Penelitian ini dilakukan pada musim gugur tahun 2022 (November-Desember) di peternakan sapi skala besar milik perusahaan susu komersial besar di Tiongkok. Peternakan tersebut memiliki sapi perah Holstein dan terletak di Daerah Otonomi Uygur Xinjiang (XUAR) di Tiongkok Barat Laut. Peternakan ini sepenuhnya mengelola kondisi peternakan sapi perah intensif dan semua hewan diberi pakan silase, bukan dibiarkan merumput. Hewan yang belum dewasa (anak sapi yang baru lahir, dan anak sapi berumur satu bulan) memiliki bagian terpisah dengan protokol perawatan, pengelolaan, dan pemberian makan khusus.

Sampel usap nasofaring dikumpulkan dari hewan (n=122) yang menderita penyakit saluran pernapasan dengan berbagai gejala klinis seperti batuk, bersin, demam di atas 40 °C, kesulitan bernapas, dll. Hewan diikat dengan benar dalam posisi berdiri dan diberi alkohol 90%. ke lubang hidung sebagai desinfektan sebelum pengambilan sampel. Penyeka transportasi steril (Transystem, Copan, Brescia, Italia) dimasukkan secara medioventral ke dalam rongga hidung dan setelah diputar beberapa kali dikeluarkan dan ditempatkan pada media transpor. Dalam waktu 12 jam sampel diangkut ke laboratorium dan diproses untuk penyelidikan bakteriologis.

Pertumbuhan bakteri

Penyeka diinokulasi pada berbagai media kultur umum dan selektif (Oxoid, Ltd., UK) seperti agar darah, agar nutrisi, agar MacConkey, agar Brilliant Green, agar de-Man-Rogosa Sharpe, agar Eosin Methylene Blue, dan agar organisme mirip pleuropneumonia , dll. Setelah inokulasi, cawan Petri diinkubasi secara aerobik pada suhu 37±1°C selama 24-72 jam. Untuk organisme yang tumbuh lambat seperti *mikoplasma* atau *mikobakterium*, inkubasi dipertahankan hingga 7 hari (Van Driessche *dkk.*, 2017; Kabir *dkk.*, 2022). Identifikasi isolat bakteri dilakukan sesuai dengan Quinn *dkk.* (1992). Semua analisis dilakukan dalam rangkap tiga dan kultur murni disimpan untuk pengujian kerentanan antimikroba.

Pengujian kerentanan antibiotik

Uji difusi cakram Kirby-Bauer diterapkan untuk menghitung pola kerentanan antibiotik dari isolat bakteri mengikuti pedoman Institut Standar Klinis dan Laboratorium (CLSI, 2021). Satu loop penuh dari setiap kultur murni disuspensikan dalam Mueller Hinton Broth (Oxoid, Ltd., UK) dan dikultur pada pelat agar Mueller Hinton setelah distandarisasi menjadi standar 0,5 McFarland. Pelat diinkubasi pada suhu 37±1°C selama 24 jam kemudian zona penghambatan diukur. Breakpoint CLSI untuk antimikroba yang diuji digunakan untuk menghitung pola kerentanan isolat bakteri.

Analisis statistik

Data dihitung dalam Spread Sheets Excel (Microsoft Inc., USA). Prevalensi organisme bakteri dalam sampel saluran pernafasan dan spektrum resistensinya dihitung dalam persentase.

HASIL DAN DISKUSI

Pada sapi potong dan sapi perah, penyakit pernapasan mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar sehingga memerlukan pemahaman mendalam mengenai agen etiologi seperti pemicu stres (misalnya, transportasi, penyapihan, perubahan pola makan, dll), interaksi antara inang dan mikrobioma, imunitas intrinsik, serta penyakit kronis. -peradangan klinis pada saluran pernafasan yang dapat menyebabkan terjadinya penyakit pernafasan. Data pengurutan generasi berikutnya menunjukkan bahwa terdapat variasi besar pada mikrobioma saluran pernapasan atas dan bawah yang berpotensi berubah menjadi patogen akibat stres (Chai *dkk.*, 2022). Genera yang terkait dengan pernapasan umum

infeksi saluran seperti *mikoplasma*, *Pasteurella* Dan *Mannheimia* diamati pada lubang hidung sapi yang sehat (Nicola *dkk.*, 2017), ketika *Pasteurella, Mikoplasma, Histophilus,* Dan *Mannheimia* dilaporkan dalam sampel nasofaring sapi yang terkena dampak BRD dan sapi sehat (Zeineldin *dkk.*, 2017).

Insiden *staf. aureus* tertinggi (83,6%) pada sampel saluran pernapasan, diikuti oleh *radang. pneumoniae* (80,3%), *Klebsiella pneumoniae* (77,0%). Bakteri lain yang ditemukan pada saluran pernapasan adalah *Mycoplasma bovis* (39.344), *Enterococcus faecalis* (31.148), *Klebsiella pneumoniae* (77.049), *Pasteurella multocida* (49.180), *Bakteriida piogenes* (36.066), *Enterococcus faecium* (45.902), *Clostridium perfringens* (60.656), *Perbedaan mikoplasma* (26.230), *Bacillus subtilis* (62.295), *Pseudomonas taetrolens* (42.623), *Mycoplasma alkalescens* (29.508), *Bacillus obstruktifus* (24.590), *radang. pneumoniae* (80.328), *staf. aureus* (83.607), *Mikrokus luteus* (60.656). Ketika *Mannheimia hemolytica* (19,6%), diikuti oleh *H. somni* (14,7%) tercatat dengan insiden paling sedikit pada sampel infeksi saluran pernafasan sapi. *H. somni* Dan *P. multocida* adalah patogen umum infeksi saluran pernafasan sapi dan kejadiannya biasanya diperkirakan kurang dari *M.hemolytica* (Anholt *dkk.*, 2017; bahasa Wales *dkk.*, 2004). *Basil* Dan *Acinetobakter* adalah dua genera bakteri yang dianggap sebagai mikrobiota nasofaring dan saluran pernapasan bagian bawah sapi tempat pemberian pakan (Zaheer *dkk.*, 2013; Zeineldin *dkk.*, 2017). Tingginya insiden genera ini pada infeksi saluran pernafasan dapat mencerminkan penyebaran mikroba pada paru-paru sebagai a akibat regurgitasi bahan pakan pada saat ruminasi dan pembentukan aerosol pada saat bersendawa pada ruminansia. Spesies bakteri seperti *Enterococcus faecium, S.pneumoniae, Enterococcus faecalis*, Dan *Basil* spp., mempunyai kelimpahan yang relatif tinggi pada sapi perah (Klima *dkk.*, 2019). *S.pneumoniae* dikaitkan dengan pneumonia pada hewan dan manusia (Borsa *dkk.*, 2019), sedangkan, *Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis*, Dan *Basil* spp. dianggap sebagai organisme komensal usus hewan dan manusia (Makarov *dkk.*, 2022).

Penelitian telah menunjukkan bahwa penyakit pernapasan adalah yang ke-2 dan penyebab utama kematian pada sapi setelah penyakit gastrointestinal. Prevalensi penyakit ini dilaporkan 4 hingga 80% pada sapi dalam literatur terbaru (Pratelli *dkk.*, 2021; Gaudino *dkk.*, 2022). Studi tentang Klima *dkk.* (2019) menangani BRD dan menemukan bahwa bronkopneumonia adalah infeksi paling umum pada penyakit saluran pernapasan sapi, diikuti oleh bronkopneumonia fibrinosa. Dari 18 kasus yang diamati, hanya satu yang terdiagnosis *Mycoplasma pneumoniae*. Selama penyelidikan yang dilakukan saat ini, bronkitis yang diikuti oleh bronkopneumonia tercatat sebagai penyakit pernafasan yang paling umum pada sapi; sedangkan bronkopneumonia fibrinosa dan *Mycoplasma pneumoniae* tercatat sebagai penyakit pernafasan yang paling sedikit prevalensinya pada sapi perah (Tabel I). *M.hemolytica* diamati sebagai organisme yang paling umum dalam berbagai penyakit saluran pernapasan. Temuan ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan hal tersebut *M.hemolytica* adalah isolat umum dari semua jenis infeksi saluran pernapasan pada sapi (Panciera *dkk.*, 2010; Anholt *dkk.*, 2017).

Tabel I. Diagnosis hewan, jumlah kasus dan spesies bakteri terisolasi dari infeksi saluran pernafasan.

Diagnosa	Jumlah kasus	Spesies bakteri terisolasi
Bronkopneumonia kronis	14	*Mannheimia haemolytica, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Mycoplasma dispar, Bacillus obstruktifus, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*
Bronkopneumonia	22	*M. haemolytica, Mycobacterium bovis, K. pneumoniae, E. faecalis, Pseudomonas taetrolens, B. obstruktifus, S. pneumoniae, S. aureus, Micrococcus luteus*
Bronkitis	28	*M. haemolytica, P. multocida, H. somni, E. faecium, C. perfringens, B. subtilis, P. taetrolens, B. obstruktifus, S. aureus, M. luteus*
rinitis	10	*E. faecalis, E. faecium, B. subtilis, S. aureus, M. luteus*
Pneumonia fibrosa	16	*M. haemolytica, K. pneumoniae, H. somni, M. dispar, P. taetrolens, S. pneumoniae, M.luteus*
Supuratif akut bronkopneumonia	9	*K. pneumoniae, B. pyogenes, C. perfringens, M. alkalescens, S. pneumoniae, S.aureus*
Trakeitis	13	*M. haemolytica, P. multocida, H. somni, E. faecium, B. subtilis, S. aureus, M. luteus*
Bronkopneumonia fibrinosa	4	*M. haemolytica, P. multocida, B. pyogenes, E. faecalis, B. obstruktifus, S.pneumoniae*
Pneumonia mikoplasma	6	*M. bovis, E. faecium, M. alkalescens, M. luteus*

Tabel II. Persentase resistensi antibakteri isolat bakteri infeksi saluran pernafasan.

Isolat bakteri (No.)	Cakram antibakteri (potensi, µg)														
	Jenderal (10)	Sp (100)	Bab (30)	Cip (5)	Pena (10)	Nor (15)	Ery (2)	Lin (30)	Tet (10)	(30)	(75)	(10)	Cef	Ce	Saya
Mannheimia hemolytica(24)	12,5	4,16	29,16	33,33	37,5	37,5	45,83	70,83	75	70,83				58.33	50
Mycoplasma bovis(48)	20,83	20,83	29,16	29,16	41,66	50		50	89,58	91,66	87,5			68,75	50
Enterococcus faecalis(38)	26,31	18,42	31,57	34,21	34,21	42,10	55,26	86,84	86,84	65,78	76,31	63,15			
Klebsiella pneumoniae(94)	26,59	21,27	26,59	27,65	29,78	42,55	35,10	57,44	62,76	67,02	61,70	55,31			
Pasteurella multocida(60)	26,66	16,66	31,66	40	35	48,33	60	95	100	80	78,33	66,66			
Histophilus somni(18) *Bakteriida*	11,11	11,11	22,22	22,22	27,77	38,88	38,88	66,66	61,11	55,55	55,55	38,88			
piogenes(44) *Enterococcus*	22,72	15,90	27,27	36,36	36,36	38,63	47,72	75	84,09	63,63	65,90	50			
faecium(56) *Clostridium*	17,87	8,92	26,78	25	32,14	41,07	53,57	71,42	80,35	78,57	69,64	46,42			
perfringens(74) *Perbedaan*	29,72	24,32	25,67	28,37	28,37	43,24	55,40	83,78	86,48	82,43	75,67	54,05			
mikoplasma(32) *Bacillus subtilis*(	40,62	28,12	34,37	46,87	40,62	56,25	62,50	93,75	93,75	93,75	87,50	68,75			
76) *Pseudomonas taetrolens*(52)	30,26	17,10	25	50	42,10	64,47	67,10	100	98,68	93,42	89,47	67,10			
Mycoplasma alkalescens(36)	23,07	15,38	34,61	44,23	30,76	57,69	61,53	80,76	86,53	86,53	76,92	44,23			
Bacillus obstruktifus(30)	36.11	25	36,11	41,66	38,88	72,22	72,22	100		100	97,22	91,66	63,88		
Streptococcus pneumoniae(98)	30	20	33,33	36,66	26,66	60		63,33	90	100	93,33	83,33	50		
Stafilokokus aureus(102)	26.54	9.19	33,68	31,64	27,56	50		65,31	96,94	98,98	83,68	74,49	50		
Mikrokus luteus(74)	33,33	13,72	41,17	37,25	19,60	56,86	70,58	96,07	95,09	92,15	76,47	57,84			
	25,67	17,56	31,08	43,24	27,02	45,94	68,91	82,43	90,54	89,18	90,54	74,32			

Jenderal, Gentamisin; Sp, Spektinomisin; Ch, Kloramfenikol; Cip, Siprofloksasin; Juga, Norfloksasin; Ery, Eritromisin; Lin, Linkomisin; Tet, Tetrasiklin; Pena, Penisilin; Cef, Cefoxitin; Ce, Cefoperazon; Am, amoksisilin.

Seperti yang ditunjukkan di Tabel II, *M.hemolytica* isolat menunjukkan resistensi >70% terhadap tetrasiklin, penisilin, dan cefoxitin. Namun, isolat ini menunjukkan resistensi paling kecil (4,16%) terhadap spektinomisin. Isolat dari *Mycoplasma bovis* ditemukan sangat resisten terhadap penisilin (91,6%), sedangkan resistensi paling kecil (20,8%) tercatat terhadap gentamisin dan spektinomisin. Isolat dari *Enterococcus faecalis* ditemukan sangat resisten (86,8%) terhadap tetrasiklin dan penisilin, diikuti oleh sefoperazon (76,3%). *K.pneumoniae* menunjukkan resistensi >60% terhadap penisilin, cefoxitin dan cefoperazone. Isolat dari *Pasteurella multocida* menunjukkan resistensi masing-masing 100% dan 95% terhadap penisilin dan tetrasiklin. Isolat dari *H. somni* ditemukan sangat resisten terhadap tetrasiklin (66,6%), sedangkan resistensi paling kecil (11,1%) tercatat terhadap gentamisin dan spektinomisin. Isolat dari *Bakteriida piogenes* menunjukkan resistensi >60% terhadap empat antimikroba yaitu penisilin (84,1%), tetrasiklin (63,6%), cefoperazone (65,9%) dan cefoxitin (63,6%); sementara resistensi paling sedikit tercatat terhadap spektinomisin (15,9%). *Enterococcus faecium* isolat menunjukkan resistensi tertinggi terhadap penisilin (80,3%), diikuti oleh cefoxitin (78,5%), tetrasiklin (71,4%) dan cefoperazone (69,6%). *Clostridium perfringens* isolat menunjukkan resistensi >80% terhadap tetrasiklin, penisilin dan cefoxitin; ketika *Perbedaan mikoplasma* menunjukkan resistensi 93,7% terhadap ketiga antimikroba ini. Isolat dari *Bacillus subtilis* Dan *Mycoplasma alkalescens* ditemukan resisten sepenuhnya (100%) terhadap tetrasiklin; ketika *Bacillus obstruktifus* Dan *Mycoplasma alkalescens* diamati 100% resisten terhadap penisilin. *S.pneumoniae* menunjukkan resistensi masing-masing sebesar 96,9% dan 98,9% terhadap tetrasiklin dan penisilin. Isolat dari *Stafilokokus aureus* menunjukkan resistensi >90% terhadap tetrasiklin, penisilin, dan sefoxitin, sedangkan resistensi paling sedikit tercatat terhadap spektinomisin (13,7%). Isolat dari *Mikrokus luteus* menunjukkan resistensi 90,5% terhadap penisilin dan cefoperazone; sementara 89,1% dan 82,4% resistensi masing-masing ditunjukkan terhadap cefoxitin dan tetrasiklin.

Studi tentang Anholt *dkk.* (2017), melaporkan itu *P. multocida, T. pyogenes* Dan *M.hemolytica* ditemukan sangat resisten terhadap antimikroba. Mayoritas isolat menunjukkan resistensi sebesar 90,2%. Timsit *dkk.* (2017) melaporkan itu *M.hemolytica* Dan *P. multocida* isolat BRD menunjukkan resistensi> 70% terhadap oksitetrasiklin. Laporan-laporan ini sesuai dengan penelitian kami saat ini, karena kami juga mencatat lebih dari 70%

resistensi untuk *P. multocida*, Dan *M. hemolytica* terhadap antibiotik tetrasiklin, penisilin, dan cefoxitin. Mutasi de novo diduga disebabkan oleh tingginya terjadinya resistensi pada isolat bakteri, yang konsisten dengan pemilihan elemen genetik mobile yang resistan terhadap beberapa obat atau patogen resisten yang memilikinya (DeDonder dan Apley, 2015).

bahasa Wales *dkk.* (2004) menerbitkan penelitian 8 tahun dari 1994-2002 dan melaporkan resistensi variabel (26-77%) terhadap *M. hemolytica*, *H. somni* Dan *P. multocida* terhadap tetrasiklin. Tetrasiklin diadopsi untuk penggunaan komersial pada tahun 1978 dan diakui sebagai obat pilihan hingga akhir abad ke-20. th abad ini karena spektrum antimikroba yang luas, ketersediaan tinggi, dan biaya rendah (Gasparrini *dkk.*, 2020). Saat ini, aksi sinergis dan efikasinya pada infeksi lokal masih dapat diterima, namun untuk infeksi sistemik khususnya yang disebabkan oleh organisme Gram negatif, efikasinya sangat lemah karena resistensi antimikroba yang signifikan yang berkembang pada patogen bakteri, manusia dan hewan komensal serta mikroba lingkungan (Chopra dan Roberts, 2001). Perlindungan dan penghabisan ribosom adalah mekanisme resistensi utama organisme bakteri terhadap tetrasiklin (Gasparrini *dkk.*, 2020).

Streptococcus pneumoniae diketahui mengkolonisasi nasofaring manusia dan hewan, namun, mereka umumnya diisolasi sebagai isolat patogen pada pneumonia fibrinosa dan bronkopneumonia. Karena tingginya kejadian *Streptokokus* di lingkungan dan mikrobioma komensal, dan paparan terhadap penggunaan antimikroba yang berlebihan, resistensi antimikroba kritis telah dilaporkan dalam penelitian pada hewan dan manusia (Hayes *dkk.*, 2020). Dalam penelitian saat ini *Streptococcus pneumoniae* menunjukkan resistensi ≥ 50% terhadap tujuh (dari dua belas) antimikroba yang diuji yang juga merupakan tanda yang mengkhawatirkan bagi dokter untuk menangani kasus klinis infeksi saluran pernapasan.

mikoplasma adalah bakteri tanpa dinding yang dilaporkan sebagai bagian dari mikroflora normal pada saluran pernafasan dan urogenital. Mereka juga sering menyebabkan mastitis pada hewan perah (Saif *dkk.*, 2022). Dalam penelitian ini, tiga spesies *Mikoplasma yaitu.*, *M. bovis, M. dispar* Dan *M. alkalescens* diisolasi dari sampel saluran pernapasan. Semua obat ini diamati sangat resisten (50-100%) terhadap eritromisin, lincomycin, tetrasiklin, penisilin, cefoxitin, cefoperazone, dan amoksisilin. Menjadi bakteri tanpa dinding, *mikoplasma* secara intrinsik resisten terhadap antimikroba yang menargetkan dinding sel. Selain itu, literatur terbaru menunjukkan bahwa obat ini telah menimbulkan resistensi terhadap beberapa antibiotik lain seperti sulfonamida, asam nalidiksat, rifampisin, polimiksin, trimetoprim, dan rifampisin (Gautier-Bouchardon, 2018). Selain itu, beberapa antibiotik lain seperti makrolida, tetrasiklin, lincosamides, tiamulin dan spektinomisin juga diamati.

sebagai tindakan mikoplasmastatik dan bukan tindakan mikoplasmacidal (Kleven dan Anderson, 1971).

KESIMPULAN

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa *staf. aureus*, diikuti oleh *Streptococcus pneumoniae* Dan *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri patogen yang paling umum pada sampel saluran pernafasan sapi. Banyak isolat bakteri diamati lebih dari 70% resisten terhadap banyak antimikroba. Hasil spektrum antimikroba menunjukkan situasi yang mengkhawatirkan dalam mengatur penggunaan antimikroba secara non-yudisial.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada manajer peternakan, staf dan rekan dokter hewan atas bantuan dan dukungan mereka dalam proses pengambilan sampel.

Pendanaan

Penelitian ini didukung oleh proyek bidang sains dan teknologi utama Korps Xinjiang (2021AB012, 2019AB029), program kerja sama sains dan teknologi internasional Korps Xinjiang (2019BC004), dan program panduan inovasi regional XPCC (2018BB036).

persetujuan IRB

Persetujuan Institutional Review Board (IRB) diberikan oleh Komite Etika Hewan Universitas Shihezi (Persetujuan No. A2022-14403).

Pernyataan etis

Penanganan hewan selama pengambilan sampel dilakukan sesuai dengan standar etika internasional dan pedoman IRB.

Pernyataan konflik kepentingan

Para penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

REFERENSI

Anholt, RM, Klima, C., Allan, N., Matheson-Bird, H., Schatz, C., Ajitkumar, P., Otto, S., Peters, D., Schmid, K. dan Olson, M., 2017. Kerentanan antimikroba bakteri penyebab kompleks penyakit pernapasan sapi di Alberta, Kanada. *Depan. Dokter hewan. Sains.*, **4:** 207. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00207

Bokma, J., Gille, L., De Bleecker, K., Callens, J., Haesebrouck, F., Pardon, B. dan Boyen, F., 2020. Kerentanan antimikroba dari *Mycoplasma bovis* diisolasi dari ternak sapi muda, susu dan daging sapi. *Antibiotik*, **9:** 882. https://doi.org/10.3390/

antibiotik9120882

Borsa, N., Di Pasquale, M. dan Restrepo, MI, 2019. Model hewan dari*Pneumonia pneumokokus.Int. J.mol. Sains.,***20:**4220.https://doi.org/10.3390/ijms20174220

Carvajal, AL dan Pérez, PC, 2020. Epidemiologi dari infeksi pernafasan. Di dalam:*Penyakit pernafasan anak: Buku teks yang komprehensif*, hal.263-272. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26961-6_28 Catry, B., Dewulf, J., Maes, D., Pardon, B., Callens, B., Vanrobaeys, M., Opsomer, G., de Kruif, A. dan Haesebrouck, F., 2016. Pengaruh konsumsi antimikroba dan jenis produksi terhadap resistensi antibakteri pada saluran pernafasan dan pencernaan sapi.*PLoS Satu*,**11**: e0146488.https://doi. org/10.1371/journal.pone.0146488

Catry, B., Haesebrouck, F., De Vliegher, S., Feyen, B., Vanrobaeys, M., Opsomer, G., Schwarz, S. dan de Kruif, A., 2005. Variabilitas resistensi didapat dari isolat Pasteurella dan Mannheimia dari nasofaring anak sapi dengan referensi khusus pada jenis kawanan yang berbeda.*Mikroba. Resistansi Obat.*,**11:** 387–394.https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.387 Chai, J., Capik, SF, Kegley, B., Richeson, JT, Powell, JG dan Zhao, J., 2022. Mikrobiota pernapasan sapi pada sapi penggemukan dan hubungannya dengan penyakit.*Dokter hewan. Res.*,**53**: 4.https://doi.org/10.1186/s13567-021-01020-x

Chopra, I. dan Roberts, M., 2001. Tetrasiklin antibiotik: Cara kerja, aplikasi, biologi molekuler, dan epidemiologi resistensi bakteri.*Mikrobiol. mol. biologi. Putaran.,***65:**232–260. https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001

Institut Standar Klinis dan Laboratorium, 2021.*Standar kinerja untuk pengujian kerentanan antimikroba*, 31sted. Suplemen CLSI M100. Institut Standar Klinis dan Laboratorium, Wayne, PA.

Confer, AW, 2009. Update patogenesis bakteri di BRD.*animasi. Hlth. Res. Putaran.,***10:**145–148.https://doi.org/10.1017/S1466252309990193

DeDonder, KD dan Apley, MD, 2015. Sebuah literatur tinjauan resistensi antimikroba pada patogen yang terkait dengan penyakit pernapasan sapi.*animasi. Hlth. Res. Putaran.,***16**: 125-134.

Dewulf, J., Catry, B., Timmerman, T., Opsomer, G., de Kruif, A. dan Maes, D., 2007. Resistensi tetrasiklin pada koliform enterik laktosapositif yang berasal dari babi penggemukan Belgia: Tingkat resistensi, resistensi ganda dan faktor risiko.*Sebelumnya Dokter hewan. medis.,***78:**339–351.https://doi.org/10.1016/j.sebelumnya.2006.11.001

Donaldson, SC, Straley, BA, Hegde, NV, Sawant, AA, DebRoy, C. dan Jayarao, BM, 2006. Epidemiologi molekuler yang resisten terhadap ceftiofur *Escherichia coli*isolat dari anak sapi perah.*Aplikasi. mengepung. Mikrobiol.*,**72:**3940–3948.https://doi.org/10.1128/AEM.02770-05

Friis, NF, 1980.*Perbedaan mikoplasma*sebagai penyebab agen dalam pneumonia anak sapi.*Akta Dokter Hewan. Pindai.,* **21**: 34.https://doi.org/10.1186/BF03546898

Gasparrini, AJ, Markley, JL, Kumar, H., Wang, B., Fang, L., Irum, S., Symister, CT, Wallace, M., Burnham, CAD, Andleeb, S. dan Tolia, NH, 2020. Enzim yang menonaktifkan tetrasiklin dari bakteri lingkungan, komensal manusia, dan patogen menyebabkan luas- resistensi spektrum tetrasiklin.*Kommun., Biol.,***3:**241.https://doi. org/10.1038/s42003-020-0966-5

Gaudino, M., Nagamine, B., Ducatez, MF dan Meyer, G., 2022. Memahami mekanisme koinfeksi virus dan bakteri pada penyakit pernapasan sapi: Tinjauan literatur komprehensif tentang bukti eksperimental.*Dokter hewan. Res.*,**53**: 1-25.https://doi.org/10.1186/s13567-022-01086-1

Gautier-Bouchardon, AV, 2018. Antimikroba resistensi di*mikoplasma*spp.*Mikrobiol. Spektrum*,**6:**6-14.https://doi.org/10.1128/mikrobiolspec.ARBA-0030-2018

Ghimire, P., Gachhadar, R., Piya, N., Shrestha, K. dan Shrestha, K., 2022. Prevalensi dan faktor yang berhubungan dengan infeksi saluran pernafasan akut pada anak balita di rumah sakit tersier terpilih di Lembah Kathmandu.*PLoS Satu*,**17**: e0265933. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265933

Haley, BJ, Kim, SW, Salaheen, S., Hovingh, E. dan Van Kessel, JAS, 2020. Perbedaan komunitas mikroba dan struktur resistome feses anak sapi yang disapih dan sapi perah laktasi pada peternakan sapi perah komersial.*makanan lahir. Jalur. Dis.,***17**: 494-503.https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2768

Hayes, K., O'Halloran, F. dan Cotter, L., 2020. Ulasan resistensi antibiotik pada kelompok B*Streptokokus*: Cerita sejauh ini.*Kritik. Pendeta Mikrobiol.,***46**: 253-269. https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1758626 Kabir, ME, Alam, MJ, Hossain, MM dan Ferdaushi, Z., 2022. Pengaruh pemberian ransum campuran total berbasis jerami padi fermentasi probiotik terhadap produksi, parameter darah dan mikrobiota feses sapi penggemukan.*J.Anim. Hlth. Melecut.*,**10**: 190-197.https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2022/10.2.190.197 Kleven, SH dan Anderson, DP, 1971.*Secara in vitro* aktivitas berbagai antibiotik melawan*sinovia mikoplasma.Avian Dis.*,**15:**551–557.https://doi.org/10.2307/1588731

Klima, CL, Holman, DB, Ralston, BJ, Stanford, K., Zaheer, R., Alexander, TW dan McAllister, TA, 2019. Mikrobioma saluran pernafasan bagian bawah dan resistensi terhadap mortalitas penyakit pernafasan sapi.*Mikroba. Ekol.,***78**: 446-456.https://doi.org/10.1007/s00248-019-01361-3

Kumar, A., Tikoo, SK, Malik, P. dan Kumar, AT, 2014. Penyakit Pernafasan Pada Ruminansia Kecil. *Dokter hewan. medis. Int.*, ID Artikel: 373642.https://doi. org/10.1155/2014/373642

Makarov, DA, Ivanova, OE, Pomazkova, AV, Egoreva, MA, Prasolova, OV, Lenev, SV, Gergel, MA, Bukova, NK dan Karabanov, SY, 2022. Resistensi antimikroba komensal *Enterococcus faecalis*Dan*Enterococcus faecium* dari hewan penghasil makanan di Rusia.*Dokter hewan. Dunia*, **15**: 611. https://doi.org/10.14202/dunia dokter hewan.2022.611-621

Nicola, I., Cerutti, F., Grego, E., Bertone, I., Gianella, P., D'Angelo, A., Peletto, S. dan Bellino, C., 2017. Karakterisasi mikrobiota saluran pernafasan atas dan bawah pada anak sapi piedmont.*Mikrobioma* **5:**152.https://doi.org/10.1186/s40168-017-0372-5

Panciera, RJ dan Confer, AW, 2010. Patogenesis dan patologi pneumonia sapi.*Dokter hewan. Klinik. N.Am. Fd. animasi. Praktek.,***26:**191–214.https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.001

Prat, C., dan Lacoma, A., 2016. Bakteri di saluran pernapasan bagaimana cara mengobatinya? Atau tidak mengobati?*Int. J. Menginfeksi. Dis.,***51**: 113-122.https://doi.org/10.1016/j. ijid.2016.09.005

Pratelli, A., Cirone, F., Capozza, P., Trotta, A., Corrente, M., Balestrieri, A. dan Buonavoglia, C., 2021. Penyakit pernafasan sapi pada anak sapi potong mendukung stres transportasi panjang: Sebuah studi epidemiologi dan strategi pengendalian dan pencegahan.*Res. Dokter hewan. Sains.,***135**: 450-455.https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.11.002

Quinn, PJ, Carter, SAYA, Markey, BK, dan Carter, GR, 1992.*Mikrobiologi veteriner klinis*. Penerbitan Wolfe. London (Inggris), hlm.61–65.

Saif, S., Kamboh, AA, Solangi, GM, Burriro, R., Baloch, H. dan Memon, AM, 2022. Prevalensi mastitis mikoplasma pada kerbau Pakistan studi percontohan di barat tengah Balochistan.*J.Anim. Hlth. Melecut.,***10**: 68-72.https://doi.org/10.17582/jurnal.jahp/2022/10.1.68.72

Silva, FLM dan Bittar, CMM, 2019. Termogenesis dan beberapa strategi pemeliharaan pedet perah pada suhu rendah. Sebuah ulasan.*J. aplikasi. animasi. Res.,***47**: 115–122.https://doi.org/10.1080/09712119.2019. 1580199

Tikofsky, LL, Barlow, JW, Santisteban, C. dan Schukken, YH, 2003. Perbandingan pola kerentanan antimikroba untuk *Stafilokokus aureus* dalam peternakan sapi perah organik dan konvensional.*Mikroba. Res Obat.,***9:**39-45.https://doi.org/10.1089/107662903322541883

Timmerman, T., Dewulf, J., Catry, B., Feyen, B., Opsomer, G., de Kruif, A. dan Maes, D., 2006. Kuantifikasi dan evaluasi penggunaan obat antimikroba dalam perawatan kelompok untuk penggemukan babi di Belgia. *Sebelumnya Dokter hewan. medis.,***74**: 251-263.https://doi. org/10.1016/j.prevetmed.2005.10.003

Timsit, E., Christensen, H., Bareille, N., Seegers, H., Bisgaard, M. dan Assié, S., 2013. Dinamika transmisi *Mannheimia hemolytica*pada sapi potong yang baru diterima pada operasi penggemukan.*Dokter hewan. Mikrobiol.,***161**: 295–304.https://doi.org/10.1016/j. dokter hewan.2012.07.044

Timsit, E., Hallewell, J., Booker, C., Tison, N., Amat, S. dan Alexander, TW, 2017. Prevalensi dan kerentanan antimikroba*Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida,*Dan *Histophilus somni*diisolasi dari saluran pernafasan bagian bawah sapi penggemukan yang sehat dan yang didiagnosis menderita penyakit pernafasan sapi.*Dokter hewan. Mikrobiol.,***208:**118-125.https://doi.org/10.1016/j.dokter hewan.2017.07.013

Van Driessche, L., Valgaeren, BR, Gille, L., Boyen, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Deprez, P. dan Pardon, B., 2017. Usap nasofaring dalam versus lavage bronkoalveolar nonendoskopi untuk isolasi bakteri patogen dari anak sapi yang disapih dengan penyakit pernapasan.*J.Dokter Hewan. Int. medis.,***31:** 946-953.https://doi.org/10.1111/jvim.14668 Welsh, RD, Dye, LB, Payton, SAYA dan Confer, AW, 2004. Isolasi dan kerentanan antimikroba bakteri patogen dari bovine pneumonia: 1994–2002. *J.Dokter Hewan. Diagnosis. Selidiki.***16**: 426–431. https://doi.org/10.1177/104063870401600510

Zaheer, R., Cook, S., Klima, C., Stanford, K., Alexander, T., Topp, E., Read, R. dan Mcallister, T., 2013. Pengaruh pemberian makrolida subterapeutik vs. terapeutik terhadap resistensi antimikroba pada *Mannheimia hemolytica*dan enterococci diisolasi dari sapi potong.*Depan. Mikrobiol.,***4**: 133.https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00133

Zeineldin, MM, Lowe, JF, Grimmer, ED, Godoy, MR, Ghanem, MM, El-Raof, YMA dan Aldridge, BM, 2017. Hubungan antara komunitas mikroba nasofaring dan bronkoalveolar pada sapi penggemukan yang sehat secara klinis. *Mikrobiol BMC.,***17:**138.https://doi.org/10.1186/s12866-017-1042-2

OPEN ACCESS Jurnal Kesehatan dan Produksi Hewan

Artikel Penelitian

Persiapan Vaksin Polivalen yang Diinaktivasi Terhadap Bakteri Patogen Umum Penyebab Mastitis Sapi dan Evaluasi Potensi Imunisasi dan Terapinya

RafikSoliman1*, RafikH.Sya2, HananMaHmoud3, Hidul fitriAboeaku-yazeed1, MdijualSiklan1, SHaimaaAsayang sekalielSaady2, kHalidSH3

1Departemen Mikrobiologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Kairo, Mesir;2Laboratorium Sentral Evaluasi Biologi Veteriner (CLEVB), Pusat Penelitian Pertanian (ARC), Kementerian Pertanian, Abbasia, Kairo, Mesir;3Lembaga Penelitian Kesehatan Hewan (AHRI), Pusat Penelitian Pertanian (ARC), Kementerian Pertanian, Giza, Mesir.

Abstrak | Sebanyak 3608 sampel susu kuartal dikumpulkan secara aseptik dari 902 sapi Friesian, dimana 68 (7,54%) menderita mastitis klinis dan 120 (13,3%) terbukti menderita mastitis subklinis. Pemeriksaan bakteriologis pada sampel susu menunjukkan isolasi patogen berikut dari kasus mastitis klinis dan subklinis; *E.coli* (29,41% dan 29,2%), *S.aureus* (19,12% dan 25%), *Str. agalactiae* (16,2% dan 16,6%), *Str. disgalaktia* (14,7% dan 20%), *Str. uberis* (7,3% dan 2,5%), *K.pneumoniae* (4,4% dan 3,3%), *Str. tinja* (4,4% dan 0%), *Str. piogenes* (2,9% dan 0%) dan *Pseudomonas aeruginosa* (1,5% dan 3,3%). Di antara mereka yang pulih *E.coli* serotipe, serotipe O111:K58 (B4) adalah yang paling umum (38,2%). Vaksin mastitis autogenous polivalen yang tidak aktif dibuat dari bakteri patogen yang paling banyak ditemui, yaitu, *E.coli*, *S.aureus*, *Str. agalactiae dan Str. disgalaktia*. Strain yang dipilih untuk persiapan vaksin diinaktivasi dengan dosis radiasi gamma minimal yang mematikan (4krad kGy/menit) dan inaktivasi bakteri dipastikan menggunakan pemeriksaan bakteriologis. Dua percobaan dilakukan; pada percobaan No.1, kemanjuran imunisasi dari vaksin yang telah disiapkan dievaluasi pada dua kelompok sapi menyusui yang tampak normal (4 ekor sapi/kelompok). Kelompok pertama tidak divaksinasi dan dijadikan sebagai kelompok kontrol selama penelitian berlangsung, sedangkan hewan pada kelompok kedua diimunisasi dengan vaksin yang telah disiapkan. Sapi yang divaksinasi menerima dua dosis vaksin (5ml) dengan interval dua minggu. Vaksin disuntikkan secara subkutan pada otot brakiosefalika. Pada percobaan No. 2, potensi terapeutik dari vaksin yang disiapkan diuji pada empat kelompok sapi menyusui yang menderita mastitis subklinis. Kelompok pertama tidak diobati. Kelompok kedua hanya diobati dengan antibiotik (neomisin dan penisilin) dan kelompok ketiga diimunisasi hanya dengan vaksin yang telah disiapkan. Kelompok keempat diobati secara bersamaan dengan antibiotik dan vaksin yang telah disiapkan. Dalam kedua percobaan, sampel darah dan susu dari sapi di semua kelompok dikumpulkan sebelum dan pada interval 2 minggu pasca imunisasi dan/atau pengobatan antibiotik. Sapi yang divaksinasi dalam dua percobaan tidak mengalami mastitis klinis selama seluruh periode pengamatan hingga 20 minggu pasca pengobatan. Konsentrasi imunoglobulin total (g/dl) yang diukur empat minggu pasca imunisasi secara signifikan lebih tinggi pada serum dan whey susu sapi yang diimunisasi dibandingkan dengan sapi yang tidak diimunisasi (P<0,01). Titer ELISA tertinggi terhadap *E.coli* (O111), *S.aureus, Str. agalactiae* Dan *Str. disgalaktia* dicatat 4 minggu pasca imunisasi dalam serum dan whey susu sapi yang diimunisasi dibandingkan dengan kelompok yang tidak diimunisasi. Pada sapi yang menderita mastitis subklinis, vaksinasi dan/atau pengobatan antibiotik menyebabkan penurunan jumlah sel somatik yang signifikan (P<0,01). Juga, penurunan CFU/ml sampel susu yang diperiksa secara signifikan (P<0,01) dan pemulihan spontan juga dicatat. Tidak ada kasus yang berlanjut menjadi mastitis klinis selama periode observasi 20 minggu. Temuan ini menunjukkan bahwa vaksin yang disiapkan ampuh dan mampu melindungi sapi terhadap mastitis serta mampu mengurangi keparahan penyakit pada sapi yang terinfeksi.

Kata kunci | Mastitis sapi, bakteri patogen, vaksin polivalen yang tidak aktif, jumlah sel somatik (SCC), imuno-tingkat globulin, titer antibodi ELISA

Diterima | 19 Agustus 2022; **Diterima** | 20 September 2022; **Diterbitkan** | 10 April 2023
*** korespondensi** | Rafik Soliman, Departemen Mikrobiologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Kairo, Mesir; **surel:** rafiksoliman108@cu.edu.eg
kutipan | Soliman R, Sayed RH, Mahmoud H, El-Yazeed HA, Saad M, Elsaady SA, Sh K (2023). Persiapan vaksin polivalen yang tidak aktif terhadap bakteri patogen umum yang menyebabkan mastitis sapi dan evaluasi potensi imunisasi dan terapeutiknya. J.Anim. Produk Kesehatan. 11(2): 99-108.
lakukan saya | http://dx.doi.org/10.17582/journal.jahp/2023/11.2.99.108
Issn | 2308-2801

hak cipta: 2023 oleh penulis. Penerima Lisensi ResearchLinks Ltd, Inggris, Inggris.
Artikel ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan lisensi Creative Commons Attribution (CC BY) (https://creativecommons. org/lisensi/oleh/4.0/).

Perkenalan

Bovine mastitis adalah penyakit penting secara ekonomi yang mempengaruhi peternakan sapi perah dan anggaran nasional melalui dua cara; biaya langsung akibat mastitis per-akut dan hilangnya sapi akibat pemusnahan dini dan biaya tidak langsung akibat berkurangnya produksi dan kualitas susu, terapi antibiotik yang mahal, dan efek samping serius dari antibiotik yang digunakan. Penggunaan antibiotik yang berlebihan dapat menghilangkan seluruh bakteri, baik patogen maupun non-patogen, suatu efek yang dilaporkan berhubungan dengan peningkatan keparahan mastitis akut (Khaitsa dkk., 2000,Schlegelov dkk., 2002);

Mastitis dapat disebabkan oleh berbagai organisme, termasuk bakteri gram negatif dan gram positif, mikoplasma, dan alga. Banyak spesies mikroba yang menjadi penyebab umum mastitis sapi, seperti*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae, Str. agalactiae*Dan*S.aureus*juga terjadi sebagai komensal atau patogen pada manusia, sedangkan spesies penyebab lainnya, seperti*Str. uberis*, *Str. disgalaktia*subsp.*Disgalaktia*atau*S.kromogen*, hampir secara eksklusif ditemukan pada hewan (Zadoks, dkk., 2011). Streptokokus lingkungan adalah agen etiologi utama dari bentuk mastitis subklinis dan klinis (Ferguson dkk., 2007;Olde Riekerink dkk., 2007). Patogen ini kini muncul sebagai salah satu penyebab paling umum dari mastitis sapi (Ebrahimi dkk., 2008).

Bentuk mastitis subklinis adalah salah satu kondisi penyakit yang paling persisten dan tersebar luas yang penting bagi kebersihan dan kualitas susu pada sapi perah (Mørk dkk., 2007;Ogola dkk., 2007;Jaime Romero dkk., 2018).

Sejak diperkenalkannya langkah-langkah pengendalian untuk mengurangi prevalensi patogen seperti mastitis menular*S.aureus* Dan*Str. agalactiae*, hanya sedikit kemajuan yang dicapai. Patogen lingkungan*Str. uberis*,*Str. disgalaktia*, Dan *Enterokokus*spp. (streptokokus tinja) terdapat dimana-mana di peternakan dan menyebabkan kesulitan manajemen yang besar. Meskipun streptokokus lingkungan dapat dibiakkan dari susu di hampir semua peternakan sapi perah, epidemiologi dan dinamika mastitis streptokokus lingkungan serta dampaknya terhadap produksi susu dan kualitas susu belum terdokumentasi dengan baik. Menurut keRamanauskienė dkk. (2008),Fatma dkk. (2019)Dan Gezehagn dkk. (2020)agen penyebab mastitis sapi yang paling sering diisolasi adalah streptokokus (41,59%) dan stafilokokus (20,35%)

Di sisi lain, mastitis merupakan salah satu penyebab utama penggunaan antibiotik pada sapi perah. Ada berbagai macam antimikroba yang digunakan untuk pencegahan dan pengobatan mastitis. Oleh karena itu, resistensi terhadap antimikroba diperkirakan terjadi. Resistensi patogen mastitis terhadap agen antimikroba merupakan tantangan lain yang terdokumentasi dengan baik dalam industri susu (Bradley 2007;Päivi Rajala-Schultz dkk., 2021).

Beberapa percobaan untuk pengembangan vaksin mastitis sapi terhadap patogen menular dan patogen lingkungan yang paling umum telah dilaporkan (Amorena dkk., 1994; Hwang dkk., 2000; Dosogne dkk., 2002). Selain itu, berbagai upaya vaksinasi telah dilakukan dengan menggunakan siaran langsung *S.aureus*strain,*stafilokokus*peptidoglikan,toksoid, atau persiapan dibunuh*S.aureus*, spesies Streptococcus dan avirulen*E.coli*strain. Sebagian besar vaksin ini meningkatkan tingkat pemulihan spontan dari infeksi dan mengurangi tingkat keparahannya, namun dalam banyak kasus tidak mencegah terulangnya infeksi baru (Monaci dkk., 2015).

Karena satu-satunya tindakan pengendalian mastitis sapi yang tersedia adalah penggunaan antibiotik yang mahal dan vaksin yang tersedia secara komersial, tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk menyiapkan vaksin autogenous polivalen yang tidak aktif terhadap bakteri patogen yang paling umum yang pulih dari kasus mastitis klinis dan subklinis di sebuah negara. peternakan sapi perah dan untuk mengevaluasi kemanjuran imunisasi dan potensi terapeutiknya.

Bahan dan metode

ScukupS

Sampel susu: Sebanyak 3608 sampel susu kuartal dikumpulkan secara aseptik dari 902 sapi Friesian. Beberapa aliran susu pertama dibuang dan 15 hingga 20 ml susu dikumpulkan secara terpisah dari empat perempat ambing ke dalam botol steril bertutup ulir. Sampel susu yang dikumpulkan dilakukan pemeriksaan bakteriologis.

Juga, jumlah sel somatik dan tingkat imunoglobulin total ditentukan (Olde dkk., 2007).

Sampel darah: Sampel darah dikumpulkan dari sapi di semua kelompok sebelum imunisasi dan pada interval 2 minggu pasca imunisasi dan/atau pengobatan antibiotik. Serum dipisahkan dan dibekukan sampai diperiksa.

PPerbaikan susu whey

Lima mg rennin dilarutkan dalam 270 ml larutan garam steril dan satu ml larutan ini ditambahkan ke 10 ml sampel susu yang telah dihilangkan lemaknya. Setelah inkubasi 30 menit pada suhu 37ºC, susu disentrifugasi pada 1000 xg selama 20 menit dan kemudian supernatan (susu whey) dipisahkan dan dibekukan sampai diperiksa (Frost dan Tina, 1988).

Bpemeriksaan akteRiologis

Satu loop penuh dari sedimen sampel susu yang diperiksa (diinkubasi sebelumnya pada suhu 37°C semalaman dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 xg selama 20 menit) digoreskan ke agar nutrisi, agar darah, dan pelat agar MacConkey. Semua pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-72 jam dan diperiksa setiap hari untuk melihat pertumbuhan bakteri. Koloni tunggal diambil dan masing-masing disalurkan ke media Edwards, agar garam Mannitol, agar garam EMB dan Pseudomonas dan diinkubasi secara aerobik pada suhu 37°C selama 24-72 jam untuk identifikasi lebih lanjut. Spesies bakteri yang diisolasi diidentifikasi sepenuhnya menurut Quinn dkk. (1994)DanDavid dkk. (2001).

SeRotyping dari isolasi bakteri yang Dipulihkan:

Yang pulih*E.coli*isolat diserotipe menggunakan komersial *Escherichia coli*antisera (Selamat Datang Diagnostik Antisera). Spesies streptokokus yang diisolasi diserotipe menggunakan reagen diagnostik dari Oxoid (10 t/ch – P. 9939). Kit ini digunakan untuk mengidentifikasi kelompok streptokokus terisolasi Lancefield A, B, C, D dan G. Kit titik kering (Staphytech plus - Oxoid. DR 100 M), dan uji aglutinasi slide lateks digunakan untuk identifikasi stafilokokus.

Persiapan vaksin bakteri mastitis sapi polivalen yang dilemahkan: Spesies bakteri yang digunakan: Spesies bakteri berikut, yang merupakan penyebab paling umum dari mastitis di peternakan sapi perah yang diperiksa, dipilih untuk persiapan vaksin mastitis autogenous polivalen yang dilemahkan. Ini termasuk*S.aureus, Str. agalactiae*,*Str. disgalaktia*Dan*E.coli*(serotipe O111: K58 (B5).

Persiapan massa antigen bakteri dari isolat yang diperoleh: Secara singkat, spesies bakteri yang digunakan diinokulasi secara terpisah ke dalam kaldu infus jantung otak dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Sel-sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi pada 1800 xg selama 20 menit pada suhu 4°C dan supernatan dibuang secara aseptik. Sedimen sel dari Spesies bakteri tersebut dicuci sebanyak 3 kali dengan PBS steril dan terakhir disuspensikan kembali dalam PBS steril.

Dalam vaksin polivalen yang disiapkan, konsentrasi komponen bakteri per dosis vaksin disesuaikan menjadi 10_{10}CFU/5 ml*S.aureus,*4x10_9CFU/5 ml*Str. agalactiae,*4x10_9CFU/5 ml*Str. disgalaktia*dan 1x10_9 CFU/5 ml*E.coli*serotipe O111 menggunakan larutan buffer fosfat (Hogan dkk., 1995;Jose dkk., 1997).

Inaktivasi sel bakteri menggunakan iradiasi gamma: Massa bakteri dari masing-masing 4 spesies bakteri dikenai uji iradiasi gamma dengan dosis berbeda untuk menentukan dosis mematikan minimum menurutAlur dkk. (1998)DanIto (1998) .Dosis minimum iradiasi pengion yang mematikan untuk patogen yang diteliti adalah 4 kGy/menit. Massa antigenik bakteri yang dilemahkan dari 4 spesies yang dimasukkan dalam konsentrasi yang disebutkan di atas dicampur dan dikeringkan dalam beku. Sel bakteri yang diinaktivasi dicampur dengan Montanide, ISA-206 (SEPPIC, Perancis) dengan perbandingan 30:70 dengan pencampuran terus menerus.Vincent dkk. (2017). Campuran didispersikan secara perlahan menggunakan homogenizer sampai diperoleh emulsi minyak yang stabil dengan viskositas rendah.

pengujian sterilitas vaksin yang disiapkan: Sediaan vaksin diinokulasi pada media bakteriologis yang berbeda, diinkubasi selama 3 hari pada suhu 37°C dan diperiksa apakah ada pertumbuhan mikroba (Vincent dkk., 2017).

ayuji coba kemanjuran vaksin

Vaksin yang telah disiapkan dievaluasi pada 6 kelompok sapi laktasi (4 ekor sapi/kelompok):

percobaan no. (1): Ini mencakup dua kelompok pertama yang secara klinis tampak normal dan digunakan dalam evaluasi kemanjuran imunisasi dari vaksin yang telah disiapkan. (Vincent dkk., 2017). Kelompok pertama tidak divaksinasi dan dijadikan sebagai kontrol selama penelitian. Kelompok kedua diimunisasi dengan vaksin yang telah disiapkan.

percobaan no. (2): Empat kelompok sapi lainnya dilibatkan dalam percobaan ini. Sapi dalam 4 kelompok ini menderita mastitis subklinis dan digunakan untuk evaluasi potensi terapeutik dari vaksin yang disiapkan 2ml/dosis (Piepers dkk., 2017). Kelompok pertama (G1) tidak diobati (baik antibiotik maupun vaksin). Kelompok kedua (G2) hanya diobati dengan antibiotik (neomisin dan penisilin). Kelompok ketiga (G3) diimunisasi dengan vaksin yang sudah disiapkan saja. Kelompok terakhir (G4) diobati secara bersamaan dengan antibiotik dan vaksin yang telah disiapkan.

Sapi yang divaksinasi menerima dua dosis vaksin dalam 2 minggu

Tabel 1: Hasil uji mastitis California untuk menentukan frekuensi mastitis klinis dan subklinis pada sapi perah dan persentase keterlibatan kuartal.

jumlah keseluruhan sapi diperiksa	kondisi klinis	nomor dari yang terkena dampak binatang	%*	jumlah keseluruhan tidak. seperempat diperiksa	jumlah seperempat terkena dampaknya	%
902	Hewan dengan mastitis klinis	68	7.54	272	83	30.5
	Hewan dengan mastitis subklinis	120	13.3	480	128	26.67

* Persentase dihitung berdasarkan jumlah sapi yang diperiksa.

Meja 2: Insiden spesies bakteri patogen pada sampel susu sapi dengan mastitis klinis atau subklinis.

Spesies bakteri terisolasi	mastitis klinis		mastitis subklinis		jumlah total terisolasi	%*
	TIDAK.	%	TIDAK.	%		
E.coli	20	29.41	35	29.2	55	29.26
S.aureus	13	19.12	30	25	43	22.87
S.disgalaktiae	10	14.7	24	20	34	18.09
S.agalactiae	11	16.2	20	16.6	31	16.49
S.uberis	5	7.3	3	2.5	8	4.26
K.pneumoniae	3	4.4	4	3.3	7	3.72
P.aeruginosa	1	1.5	4	3.3	5	2.65
E. fecalis	3	4.4	0	0	3	1.60
S.pyogenes	2	2.9	0	0	2	1.06
Total	68		120		188	100

* Dihitung sehubungan dengan jumlah total isolat.

tabel 3: Jenis, jumlah dan persentase *E.coli* serotipe diperoleh dari sampel susu sapi yang menderita mastitis klinis dan subklinis.

E.coli serotipe	Hewan dengan mastitis klinis		Hewan dengan mastitis subklinis		total	
	TIDAK.	%	TIDAK.	%	TIDAK.	%
O111:K58 (B4)	9	45	12	34.3	21	38.2
O127:K63 (B8)	7	35	8	22.8	15	27.3
O 55:K59 (B5)	3	15	7	20.0	10	18.2
O125:K70 (B15)	1	5	5	14.3	6	10.9

tabel 4: Imunoglobulin total (gm/dl) dalam serum dan whey susu sapi sehat yang diimunisasi dengan vaksin mastitis polivalen yang dilemahkan.

kelompok sapi perah	Konsentrasi imunoglobulin (gm/dl) pasca imunisasi			
	Dalam serumnya		Dalam susu whey	
	2 minggu	4 minggu	2 minggu	4 minggu
Pengendalian (Sapi yang tidak divaksin)	1,48 ± 0,012	1,56 ± 0,034	2,83 ± 0,034	2,88 ± 0,043
Sapi yang divaksinasi	1,57 ± 0,036*	1,80 ± 0,049*	3,15 ± 0,018*	3,31 ± 0,030*

* Signifikan pada P <0,01 menggunakan uji-t dibandingkan dengan kontrol.

interval dan vaksin disuntikkan secara subkutan pada otot brakiosefalika.

Sampel darah dan susu sapi pada semua kelompok dikumpulkan sebelum dan pada interval 2 minggu pasca imunisasi dan/atau pengobatan antibiotik. Sapi di semua kelompok dipantau secara klinis sepanjang periode penelitian.

SANALISIS TATISTIK

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji t-student dan One-way ANOVA menurut Petrie dan Watson (1999).

Hasil

Sebanyak 3608 sampel susu triwulan dilakukan secara aseptik

tabel 5: Pembacaan ELISA (OD) dan titer antibodi antibakteri spesifik yang sesuai dalam serum dan whey susu sapi perah yang tampak sehat yang diimunisasi dengan vaksin bakteri polivalen yang dilemahkan.

		Membaca	kontrol tidak diimunisasi Grup (coV)*	Sapi yang tampak sehat (GI) yang diimunisasi			
				E.coli	*S.aureus*	*Str. agalactiae*	*Str. disgalaktia*
Serum sampel	2 minggu	OD	0,465	0,584	0,615	0,579	0,499
		titer	0	1/160	1/160	1/160	1/80
	4 minggu	OD	0,462	0,642	0,662	0,656	0,534
		titer	0	1/320	1/640	1/320	1/160
susu air dadih sampel	2 minggu	OD	0,415	0,640	0,618	0,557	0,508
		titer	0	1/160	1/160	1/160	1/160
	4 minggu	OD	0,411	0,752	0,641	0,595	0,539
		titer	0	1/640	1/320	1/320	1/320

Hasilnya dinyatakan sebagai OD dan titer antibodi yang representatif.

* COV = rata-rata pembacaan (OD) kelompok kontrol + 2 x SE

dikumpulkan dari 902 sapi Friesian, dimana 68 hewan (7,54%) menderita mastitis klinis dan 120 sapi (13,3%) terbukti menderita mastitis subklinis menggunakan uji mastitis California (Tabel 1).

Pemeriksaan bakteriologis sampel susu yang dikumpulkan dari sapi dengan bentuk mastitis klinis dan subklinis:

Beberapa spesies bakteri ditemukan dari sampel susu yang diperiksa (Meja 2). Spesies bakteri yang paling umum adalah *E.coli*(29,26%),*S.aureus*(22,87%),*Str. disgalaktia*(18,09%) dan *Str. agalactiae*(16,49%). Beberapa spesies bakteri lain tercatat pada tingkat yang lebih rendah termasuk *Str. uberis, K. pneumoniae, P. aeruginosa, E. fecalis*Dan*Str. piogenes*. Di antara mereka yang terisolasi*E.coli*isolat, serotipe O111:K58 (B4) adalah yang paling umum (38,2 %) (Tabel 3).

percobaan no. (1)

Kemanjuran imunisasi dari vaksin mastitis polivalen yang dilemahkan pada sapi menyusui yang tampak sehat: **gejala klinis dan reaksi pasca vaksinasi:**Sapi yang divaksinasi dengan vaksin mastitis polivalen yang dilemahkan menunjukkan reaksi vaksinasi ringan di tempat suntikan dalam bentuk pembengkakan yang mereda dalam waktu 4 - 6 hari setelah vaksinasi. Selain itu, kenaikan ringan pada suhu rektal (dari 0,5 menjadi 1°C) pada hewan yang disuntik dicatat satu jam setelah waktu penyuntikan dan bertahan selama 2 hari (data tidak ditampilkan). Tidak ada penurunan produksi susu yang signifikan setelah imunisasi dengan vaksin yang telah disiapkan. Semua sapi dalam kelompok ini tidak mengalami mastitis klinis selama seluruh periode pengamatan hingga 20 minggu pasca vaksinasi.

Konsentrasi imunoglobulin: Seperti yang ditunjukkan di Tabel 4, peningkatan konsentrasi imunoglobulin (g/dl) yang signifikan (P <0,01) tercatat pada 4thminggu pasca imunisasi sapi yang tampak sehat mencapai 1,80 ± 0,049 dan 3,31 ± 0,030 g/dl pada serum dan susu whey, masing-masing, dibandingkan dengan 1,56 ± 0,034 dan 2,88 ± 0,043 dalam serum dan susu whey dari sapi kontrol yang tidak divaksinasi.

EliSaHASIL

Seperti yang ditunjukkan diTabel (5), tingkat antibodi spesifik antigen tertinggi terhadap komponen imunogenik dari vaksin yang disiapkan tercatat dalam serum dan whey susu pada 4th minggu pasca imunisasi pada sapi yang diobati dengan vaksin saja. Mencapai 1/320 melawan*E.coli*(HAI) dan *Str. agalactiae*, 1/640 melawan S. *aureus*dan 1/160 untuk*Str. disgalaktia*, dalam serum sementara mencapai 1/640 melawan*E.coli* dan 1/320 melawan*S.aureus*,*Str. agalactiae*Dan*Str. disgalaktia*dalam susu whey.

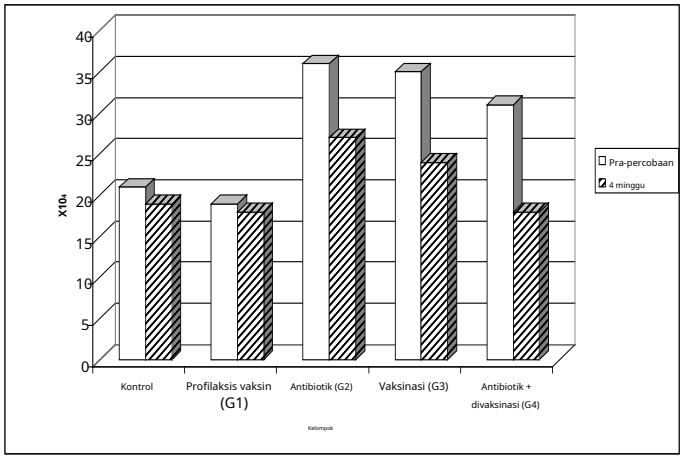
percobaan no. (2):

Potensi terapeutik dari vaksin autogenous mastitis bakteri polivalen yang dilemahkan pada sapi yang menderita mastitis subklinis:

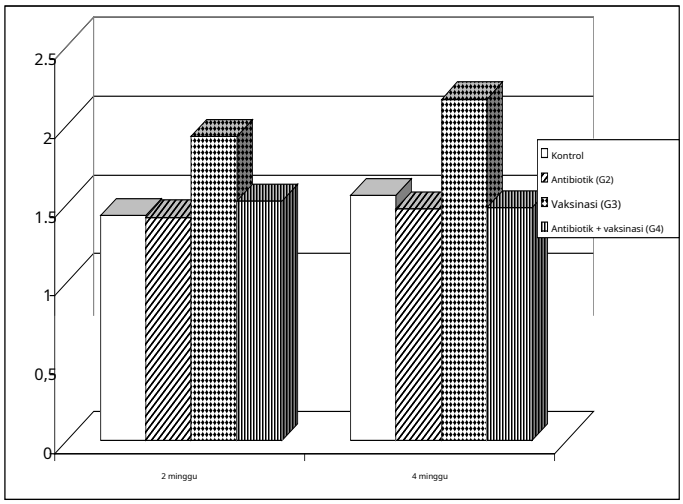
1. pengaruh vaksinasi terhadap jumlah sel somatik (scc): Analisis SCC pada sampel susu yang dikumpulkan sebelum dan 4 minggu pasca vaksinasi pada sapi yang menderita mastitis subklinis ditunjukkan padaGambar (1). Penurunan SCC yang signifikan (P <0,01) tercatat setelah 4 minggu pasca vaksinasi dan/atau pengobatan antibiotik. Pada kelompok yang diobati dengan antibiotik, SCC menurun dari 35 x 10_4menjadi 27x10_4. Pada kelompok yang divaksinasi SCC menurun dari 34 x 10_4 menjadi 24x10_4. Pada kelompok ketiga yang diobati dengan antibiotik dan vaksin, SCC menurun secara signifikan sebesar 30 x 10_4menjadi 18x10_4.

2. pengaruh vaksinasi terhadap konsentrasi imunoglobulin: Seperti yang ditunjukkan diGambar (2)Dan(3), peningkatan total imunoglobulin dalam serum dan whey susu yang signifikan (P <0,01) tercatat pada sapi yang diimunisasi dengan vaksin yang telah disiapkan saja. Pada sapi yang tidak diimunisasi dan pada sapi yang diobati dengan antibiotik atau dengan vaksin dan antibiotik, tidak ada peningkatan total globulin dalam serum yang signifikan (P > 0,05).

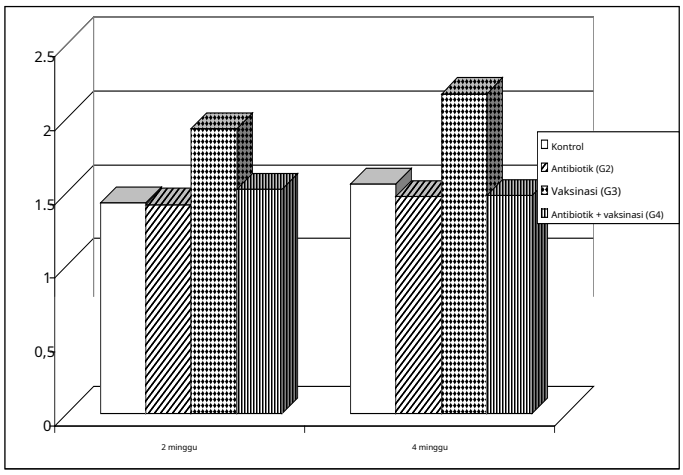
dan susu whey dicatat.



Gambar 1: Jumlah sel somatik (SCC)/ml sampel susu pada kelompok sapi perah yang diberi perlakuan berbeda sebelum percobaan dan pada 4 minggu pasca imunisasi.



Gambar 2: Imunoglobulin total (gm/dl) dalam serum kelompok sapi yang diberi perlakuan berbeda dengan mastitis subklinis.



Gambar 3: Imunoglobulin total (gm/dl) dalam susu whey dari kelompok sapi yang diberi perlakuan berbeda dengan mastitis subklinis.

diskusi

Meskipun program pengendalian mastitis standar telah diterapkan, mastitis secara ekonomi masih merupakan salah satu penyakit terpenting pada hewan perah. Pendekatan untuk meningkatkan kekebalan sapi untuk mencegah mastitis dan meminimalkan penggunaan antibiotik telah mendapat banyak perhatian. Namun, karena berbagai alasan, vaksin yang dikembangkan untuk pencegahan dan pengendalian mastitis hanya mencapai keberhasilan yang terbatas. Banyaknya patogen yang dapat menyebabkan mastitis dan kurangnya pengetahuan tentang imunologi kelenjar susu, faktor virulensi bakteri dan mekanisme patogenesis merupakan faktor yang menghambat pengembangan vaksin mastitis yang efektif. Beberapa upaya telah dilakukan untuk mengembangkan dan mengevaluasi vaksin monovalen dan polivalen terhadap patogen mastitis yang paling umum*S.aureus, Str. agalactiae, E.coli*Dan*Str. uberis*.Secara umum, tersedia secara komersial*S.aureus*Meskipun vaksin mempunyai kemampuan yang terbatas hingga sedang dalam mencegah infeksi baru, vaksin tersebut dapat meningkatkan angka kesembuhan spontan dan mengurangi infeksi kronis (Piepers dkk., 2012;Schukken, dkk., 2014).

Bagian pertama dari penelitian ini dirancang untuk menentukan bakteri patogen paling umum yang mendasari kasus mastitis klinis atau subklinis pada sapi.*E.coli*,*S.aureus*, *Str. agalactiae*Dan*Str. disgalaktia*adalah agen etiologi yang paling umum tercatat. Oleh karena itu, vaksin autogenous polivalen tidak aktif yang dirancang khusus dibuat dari keempat spesies ini dan potensi imunisasi dan imunoterapinya ditentukan. Spesies bakteri terpilih ditumbuhkan, dicampur dan diinaktivasi menggunakan radiasi gamma. Dosis iradiasi inaktivasi minimum ditentukan dan terbukti 4 krad/menit (kGy). Demikian pula, Hammad dkk. (1998)melaporkan bahwa dosis iradiasi 4 kGy sangat mengurangi jumlah mikroba dan memperpanjang umur simpan makanan. Variasi antara intensitas dosis iradiasi (2-10 kGy) yang diperlukan untuk inaktivasi mikroba telah dilaporkan oleh beberapa penulis (Cho dkk., 1986;Leslie, dkk., 2008;Fahmida dkk., 2013,Wilmar dkk., 2019;Hawa dkk., 2020). Variasi intensitas iradiasi yang diperlukan untuk inaktivasi ternyata dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain spesies mikroba yang terlibat dan sifat bahan yang diiradiasi (larutan). *vs.*bentuk kering) (Andreia dkk., 2016; Yifan dkk., 2018).

Potensi imunisasi dan imunoterapi dari vaksin autogenous bakteri mastitis polivalen yang dilemahkan ditentukan pada sekelompok sapi di peternakan sapi perah dimana spesies bakteri yang disebutkan di atas ditemukan. Penentuan potensi imunisasi dari vaksin yang telah disiapkan dilakukan pada sapi yang tampak sehat, sedangkan efikasi imunoterapi dievaluasi pada sapi yang menderita mastitis subklinis. Sedikit bengkak di

tempat suntikan diamati pada semua sapi yang divaksinasi. Hal ini berlanjut selama 2-6 hari pasca penyuntikan dan kembali normal setelahnya. Pembengkakan ini bisa dianggap sebagai reaksi normal terhadap vaksin yang disuntikkan. Vaksin dibuat menggunakan air suling steril yang bebas dari unsur pirogenik dan toksigenik. Dibandingkan dengan sapi kontrol yang tidak diimunisasi, peningkatan suhu rektal (0,5 hingga 1 °C) terlihat pada sapi yang disuntik. Itu berlangsung selama 2 hari dan menjadi normal setelah itu. Namun, reaksi kulit dan peningkatan suhu dapat disebabkan oleh sensitisasi sebelumnya pada hewan yang disuntik terhadap satu atau lebih komponen antigenik dari vaksin yang digunakan (Dosogne dkk., 2002). Tidak ada penurunan produksi susu yang signifikan pada hari-hari setelah imunisasi.

Kemanjuran imunisasi dari vaksin yang disiapkan ditentukan dengan menggunakan dua parameter; pertama, titer antibodi spesifik yang dikembangkan terhadap komponen mikroba vaksin dan kedua, tingkat imunoglobulin total dalam serum dan susu sapi yang diimunisasi. Dalam penelitian ini, evaluasi vaksin hanya terbatas pada kemanjuran imunisasinya saja, dimana kemanjuran perlindungan dari vaksin tersebut tidak dapat ditentukan. Tidak mungkin bagi kami untuk melakukan percobaan infeksi intramammary pada sapi yang diimunisasi.

Investigasi pengaruh imunisasi sapi dengan vaksin yang telah disiapkan terhadap kadar serum imunoglobulin total pada minggu ke-2 dan ke-4 pasca imunisasi menunjukkan adanya peningkatan kadar imunoglobulin pada sapi yang diimunisasi, yaitu mencapai 1,57 dan 1,80 g/dl dibandingkan dengan 1,48 dan 1,56 g/dl pada kelompok kontrol yang tidak diimunisasi. Demikian pula, kadar imunoglobulin total dalam whey susu sapi yang diimunisasi mencapai 3,15 dan 3,31 g/dl pada 2 dan 4 minggu pasca imunisasi dibandingkan dengan 2,83 dan 2,88 g/dl pada sapi kontrol yang tidak diimunisasi. Hasil serupa juga dicatat olehGilman dkk. (1991)DanTomita dkk. (1998).

Imunisasi sapi dengan vaksin mastitis bakteri polivalen yang dilemahkan secara bervariasi merangsang produksi antibodi spesifik terhadap komponen bakteri dari vaksin baik dalam serum maupun whey susu. Dua minggu pasca imunisasi, titer antibodi spesifik sebesar 1/160*E.coli*,*S.aureus*,*Str. agalactiae*dan titer 1/80 melawan*Str.disgalaktia*diukur dalam serum sapi yang diimunisasi. Empat minggu pasca imunisasi (2 minggu setelah dosis booster) dilaporkan terjadi peningkatan yang signifikan*S.aureus*, dimana titer antibodi mencapai 1/640. Juga peningkatan anti-*E.E.coli*dan anti-*Str. agalactiae* titer antibodi yang mencapai 1/320 diukur. Peningkatan sebesar 1/160 tercatat terhadap*Str.disgalaktia*. Hasil serupa dilaporkan oleh beberapa penulis yang menggunakan vaksin monovalen atau polivalen (Amorena dkk., 1994;Zuhair, 2017). Juga,Tomita dkk. (1995 dan 1998)DanHogan (1999)melaporkan peningkatan yang signifikan dalam titer antibodi IgG terhadap *E.coli*dalam serum sapi yang divaksinasi*E.coli*vaksin j5.

Pada susu whey sapi yang diimunisasi, antibodi anti-bakteri yang terdeteksi setelah dua minggu setelah imunisasi mencapai 1/160- dan peningkatan dua kali lipat diukur dua minggu setelah dosis booster. Hasil serupa dilaporkan olehTomita dkk. (2000). Namun, diamati bahwa tingkat anti*E.coli*antibodi lebih tinggi pada susu whey dibandingkan tingkat anti*S.aureus* antibodi berbeda dengan apa yang tercatat dalam serum sapi yang diimunisasi. Hal ini mungkin disebabkan oleh kelas atau subkelas imunoglobulin yang diproduksi untuk melawan komponen bakteri yang berbeda dalam vaksin dan mungkin juga untuk komponen bakteri yang diproduksi untuk melawannya*E.coli*merupakan isotipe IgG1 yang lebih mudah disekresikan dalam susu dibandingkan dengan subkelas imunoglobulin lain yang ditemukan dalam konsentrasi tinggi dalam darah (Amorena dkk.,1994).Tomita dkk. (1998) melaporkan juga bahwa vaksinasi sapi dara dengan*S.aureus*,*Str. agalactiae* Dan*Str. uberis*pada hari ke 55 dan 45 sebelum melahirkan menyebabkan peningkatan yang signifikan pada kadar IgG1 serum darah, sedikit peningkatan kandungan IgG2 (sebagai persentase dari total imunoglobulin) dan penurunan kandungan IgM selama 1 bulan setelah melahirkan.

Meskipun terdapat fakta bahwa antibodi spesifik terhadap komponen bakteri dari vaksin terdeteksi dalam darah dan susu sapi yang diimunisasi dan tidak ada sapi yang divaksinasi yang mengalami mastitis klinis selama seluruh periode pengamatan (20 minggu), tidak ada pernyataan jelas yang dapat disimpulkan mengenai hal ini. sifat protektif dari vaksin yang disiapkan. Evaluasi kemanjuran perlindungan memerlukan infeksi eksperimental intramammary pada sapi dengan bakteri patogen dalam model eksperimental,

Pada percobaan kedua, potensi imunoterapi dari vaksin yang telah disiapkan dievaluasi pada sapi yang didiagnosis menderita mastitis subklinis dimana komponen vaksin dari spesies bakteri diisolasi. Semua sapi dalam 3 kelompok perlakuan tidak mengalami mastitis klinis selama seluruh periode pengamatan yang diperpanjang selama 20 minggu. Diamati juga bahwa hewan yang diobati dengan vaksin saja mengembangkan peningkatan antibodi spesifik yang signifikan terhadap komponen mikroba dari vaksin yang digunakan. Namun, pada kelompok yang diobati dengan vaksin dan antibiotik, tingkat respons antibodi lebih rendah. Hal ini mungkin disebabkan oleh kemungkinan efek imunosupresif dari antibiotik yang digunakan.

Analisis hasil SCC yang ditentukan 2 dan 4 minggu pasca pengobatan menunjukkan penurunan yang signifikan setelah 4 minggu sejak dimulainya pengobatan pada tiga kelompok perlakuan berbeda. Namun, pada kelompok yang diobati dengan anti-

biotik dan vaksin, pengurangan jumlah SCC sangat signifikan dan jumlah sel kembali ke angka yang sama dengan yang dihitung pada kontrol yang tampaknya normal. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Jose dkk. (1997).

Meskipun keberhasilan vaksin mastitis sulit untuk ditentukan, namun penggunaannya untuk tujuan terapeutik terbukti efektif karena menghentikan perkembangan kasus subklinis untuk berlanjut ke mastitis klinis dan juga dikaitkan dengan penurunan SCC ke tingkat normal. Hasil serupa juga dicatat oleh Hogan dkk. (1995) yang melaporkan pemulihan yang cepat dan pengurangan tanda-tanda klinis eksperimental *E.E.coli* mastitis melalui vaksinasi.

Pemulihan spontan dan pengurangan signifikan CFU mikroba / ml sampel susu yang diperiksa dicatat dalam penelitian ini. Leitner dkk. (2004) melaporkan bahwa 30% dari *S.aureus* sapi yang terinfeksi ketika divaksinasi dengan iklan *S.aureus* Vaksin ini tetap bebas infeksi hingga akhir uji coba selama 348 hari, yang menunjukkan peran kuratif dari vaksin ini.

Sebuah penelitian terbaru yang dilakukan oleh Athar (2007) menunjukkan bahwa vaksin mastitis bakteri polivalen yang dibuat secara lokal (mengandung bakteri mati *S.aureus, Str. agalactiae,* Dan *E.coli* dengan berbagai bahan pembantu) tidak hanya mencegah infeksi baru tetapi juga menyembuhkan infeksi yang sudah ada dari organisme ini pada kerbau perah. Pengamatan serupa dilakukan dengan persiapan lokal *S.aureus* vaksin (vaksin hidup yang dilemahkan, bakterin biasa, bakterin tambahan dekstran sulfat, dan bakterin tambahan minyak (Ahmad, 2010). Juga Hwang dkk. (2000) melaporkan kemanjuran terapi autogenous *S.aureus* vaksin di Korea. Mereka menyelidiki kemanjuran terapi autogenous *S.aureus* bakteri toksoid pada sapi menyusui yang menderita penyakit subklinis *S.aureus* mastitis dan membuktikan bahwa pengobatan bakteri toksoid autogenous melawan *S.aureus* mastitis subklinis pada sapi menyusui meningkatkan angka kesembuhan infeksi yang ada, mengurangi keparahannya dan juga mencegah terjadinya infeksi baru. Menarik untuk dicatat bahwa sebagian besar *S.aureus* vaksin yang dikembangkan untuk pencegahan infeksi memiliki efek kuratif yang lebih baik daripada agen pencegahan (Clegg dkk., 2021).

kesimpulan

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa vaksin autogenous polivalen inaktif yang disiapkan dan program imunisasi termasuk injeksi subkutan dua dosis vaksin, masing-masing 2ml/hewan dengan interval 2 minggu pada otot brakiosefalika berkhasiat dalam menurunkan kejadian infeksi intramammary akibat *S. aureus, Coliform, Str. agalaktia* Dan *Str. disgalaktia* pada sapi. Selain itu, imunisasi secara signifikan mengurangi keparahan gejala menyebabkan peningkatan yang signifikan pada angka kesembuhan spontan pada sapi yang menderita mastitis subklinis dimana tidak ada kasus yang mengalami mastitis akut.

Ucapan Terima Kasih

Pekerjaan ini didukung oleh Science, Technology and Innovation Funding Authority (STDF) ID 27811.

konflik kepentingan

Para penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

PERNYATAAN BARU

Komite Perawatan dan Penggunaan Hewan Institusional di Laboratorium Pusat Evaluasi Biologi Veteriner menyetujui naskah penelitian dan telah ditinjau di bawah otoritas penelitian kami dan memenuhi standar bioetika.

KONTRIBUSI PENULIS

Eksperimen dirancang oleh NGS dan MSA, dan eksperimen dilakukan oleh HAK, NMA, dan MSA. Analisis data dilakukan oleh NMA. ISY dan MSA. Naskah ditulis oleh HAK dan MSA.

Referensi

Ahmad T, Muhammad G, Yousaf A., Nadeem M, Zafar MA (2010). Khasiat Terapi Antibiotik dan Bakteri-Toksoid pada Mastitis Streptococcus Agalactiae Sub Klinis pada Kerbau Perah. Meninjau ulang. Dokter hewan. 21 (1): 488-492.

Alur MD, Kamot AS, Doke SN, Nair PM (1998). "Pengembangan proses indikasi pemberantasan salmonella dan staphylococcus pada produk daging babi. J. Ilmu Pangan. Teknologi., 35 (1): 15-20.

Amorena B, Baselga R., Albzin I. (1994). Penggunaan liposom-ekspolisakarida imunopotensiasi sebagai komponen vaksin stafilokokus mastitis ovine. Vaksin., 12 (3): 243-249.https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90201-1

Andreia I. Pimenta, Duarte Guerreiro, Joana Madureira, Fernanda MA Margaça, Sandra Cabo Verde (2016). Melacak Inaktivasi Adenovirus Manusia dengan Radiasi Gamma dalam Kondisi Lingkungan Berbeda. Mikrobiol Lingkungan Aplikasi.; 82 (17): 5166–5173. Diterbitkan online 2016 17 Juni. Diterbitkan online 2016 15 Agustus. PMCID: PMC4988180.https://doi.org/10.1128/AEM.01229-16

Athar (2007). Sebuah studi pendahuluan tentang efek inaktivasi vaksin mastitis polivalen terhadap kuantitas dan kualitas susu pada kerbau perah. Dokter Hewan Pakistan. J., 27 (2): 85-91

Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Hijau LE, GreenMJ Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Hijau LE, Hijau MJ.(2007). Survei kejadian dan etiologi mastitis di peternakan sapi perah di

Inggris dan Wales. Dokter hewan. Rek.; 24; 160 (8):253-7.https://doi.org/10.1136/vr.160.8.253

Calvinho; JIKA; Tarabla, HD; Canavesio, VR; Zubrigen, MA; Quaino, O. dan De-Canavesio, VR (1989): Evaluasi vaksin hidup komersial terhadap*Stafilokokus aureus*mastitis. Dokter hewan. Arg., 6 (56): 380-383.

Cho HO, MW Byun, JH Kwon, JW Lee, JS Yang (1986). Perbandingan perlakuan etilen oksida (ED) dan Iradiasi terhadap sterilisasi rempah-rempah. Ilmu Pengetahuan Makanan J. Korea. Teknologi., 18: 283.

Clegg J, Soldaini E, McLoughlin RM, Rittenhouse S, Bagnoli F dan Phogat S (2021) Penelitian dan Pengembangan Vaksin Staphylococcus aureus: Masa Lalu, Sekarang dan Masa Depan, Termasuk Strategi Terapi Baru. Depan. imunol. 12:705360.https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705360 David E. Kerr, Karen Plaut, A. John Bramley, Christine M. Williamson, Alistair J. Lax, Karen Moore, Kevin D. Wells, Robert J. Wall (2001). Ekspresi lisostaphin pada kelenjar susu memberikan perlindungan terhadap infeksi stafilokokus pada tikus transgenik. Nat. Bioteknologi., 19: 66 – 70.https://doi. org/10.1038/83540

Dosogne H, Meyer E, Sturk A, van Loon J, Massart-Leën AM, Burvenich C. (2002). Pengaruh pengobatan enrofloxacin pada endotoksin plasma pada sapi*Escherichia coli*mastitis. Peradangan Res., 51 (4): 201-5.https://doi.org/10.1007/PL00000293

Ebrahimi A, Nikookhah F, Nikpour S, Majiian F dan Gholami M (2008). Isolasi Streptococci dari sampel susu sapi mastitis normal, akut dan subklinis serta penentuan pola kerentanan antibiotik. Pak J.Biol. Ilmiah, 11 (1): 148-50.https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.148.150

Eve V Singleton, Shannon C David, Justin B Davies, Timothy R Hirst, James C Paton, Michael R Beard, Farhid Hemmatzadeh, Mohammed Alsharifi (2020). Sterilitas patogen yang diiradiasi gamma: rumus matematika baru untuk menghitung dosis sterilisasi. J. Radiat. Res., 61 (6): 886–894. Diterbitkan online 2020 15 Sep. PMC7674690 https://doi.org/10.1093/jrr/rraa076

Fahmida BA, Kazi TA, SM Asaduzzaman, Kazi NH (2013). Pengaruh Iradiasi Gamma terhadap Mikroflora Bakteri yang Berhubungan dengan Membran Ketuban Manusia. Bioma. Res. Int., PMC3770025- PMID: 24063009https://doi. org/10.1155/2013/586561

Fatma M. Abo Zaid, Hassan Y. Abd ElHamed, El-Sagher O. Ahmed, Amal M. Eid, Adel EA Mohamed (2019): Bakteri yang Sering Diasingkan Dari Sapi Menyusui Dengan Mastitis Klinis Dan Subklinis Di Kegubernuran Gharbia, Mesir. Pantat. Universitas. Banteng. Mengepung. Res. 22(1): 83-93.https://doi.org/10.21608/auber.2019.99900

Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. (2007): Prevalensi patogen mastitis di Ragusa, Sisilia, dari tahun 2000 hingga 2006. J. Ilmu Susu; 90 (12): 5798-813.https://doi.org/10.3168/jds.2006-903

Frost AJ, Tina M. (1988). Efeknya terhadap peradangan pada vaksinasi kelenjar susu sapi dengan ekstrak dinding sel *Stafilokokus aureus*. J.Dokter Hewan. Med., B35: 688-694. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00545.x

Gezehagn K, Betelihem T, Belege T (2020). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Patogen Utama dari Sapi Mastitik Klinis di Kota Asella, Ethiopia. Vet Med Int., 6656755. Diterbitkan online 2020 13 November.https://doi. org/10.1155/2020/6656755, PMID: PMC7683167, PMID: 33274039.

Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P. (eds) (1991). Goodman dan Gilman: Dasar Farmakologis Terapi." 8th Ed., Pergamon Press, Anggota Maxwell MacMillan Pergamon Publishing Corporation New York, Oxford, Beijing, Frankfurt, Sydney, Toronto.

Hammad AAL, TM El-Mangy, AK Mabrouk (1998). Rak-perpanjangan umur dan peningkatan kualitas mikrobiologi sosis segar dengan iradiasi." 4thKonferensi Arab tentang Penggunaan Energi Atom Secara Damai.

Hogan JS, Weiss WP, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS, Sordillo LM (1995). Efek dari *Escherichia coli*Naksin J5 pada mastitis coliform klinis ringan. J. Ilmu Susu, 78 (2): 285-290.https://doi.org/10.3168/jds. S0022-0302(95)76636-X

Hogan JS, Bogacz VL, Aslam M., Smith KL (1999): Khasiat sebuah*Escherichia coli*Bakterin J5 diberikan pada sapi dara primigravida. J. Ilmu Susu, 82 (5): 939-943.https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75312-9

Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ (2011). Aspek ekonomi dari mastitis: perkembangan baru. Dokter Hewan Selandia Baru. J., 59: 16–23. https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165

HwangCY, Pak SI, Han HR. (2000).Pengaruh autogenous bakteri toksoid pada sapi menyusui dengan Staphylococcus aureus subklinismastitis.J.Dokter Hewan. medis. Ilmiah, 62 (8): 875-80 https://doi.org/10.1292/jvms.62.875.

Ito H. (1998). Efek iradiasi dari*Escherichia coli*O157:H7 masuk daging. Shokuhin-Shoska, 33 (1 -2): 29-32.https://doi. org/10.5986/jrafi.33.29

Jaime R, Efraín B, Carlos M (2018). Menilai Dampak Keuangan Mastitis Subklinis di Peternakan Sapi Perah Kolombia. Dokter Hewan Depan. Sains, 5: 273.https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00273, ID PMC: PMC6277785 PMID: 30542654.

Jose A. Giraudo, Horacio, Alberto, Giraudo (1997). Uji coba lapangan vaksin terhadap mastitis sapi. J. Ilmu Susu, 80: 845-853. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76006-5

Khaitsa ML, Wittum TE, Smith KL, Henderson JL dan Hoblet KH (2000). Karakteristik kawanan dan praktik manajemen yang terkait dengan jumlah sel somatik tangki curah dalam kawanan dalam program resmi Dairy Herd Improvement Association di Ohio. Am J Dokter Hewan Res., 61 (9): 1092-8.https://doi. org/10.2460/ajvr.2000.61.1092

Leitner, U.Merin, N.Silanikove (2004). Perubahan pada Susu Komposisi yang Dipengaruhi Mastitis Subklinis pada Kambing G. American Dairy Science Association, J. Dairy Sci., 87: 1719– 1726 https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73325-1 Leslie A.Dauphin, Bruce R.Newton, Max V.Rasmussen, Richard F.Meyer, Michael D.Bowen (2008). Iradiasi Gamma Dapat Digunakan Untuk Menonaktifkan*Bacillus antrakis*Spora Tanpa Mengompromikan Sensitivitas Uji Diagnostik.Aplikasi. Mengepung. Mikrobiol., 74 (14): 4427–4433. Diterbitkan online 2008 30 Mei.https://doi.org/10.1128/AEM.00557-08

Monaco C., Nanchahal J., Taylor P., Feldmann M. (2015). Anti-Terapi TNF: masa lalu, sekarang dan masa depan. Int. imunol. 27, 55–62.https://doi.org/10.1093/intimm/dxu102

Mørk T, Waage S, Tollersrud T, Kvitle B, Sviland S (2007). Klinismastitispada domba betina; bakteriologi, epidemiologi dan gambaran klinis. Akta Dokter Hewan. Pindaian., 24; 49:23.https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-23

OgolaH, Shitandi A, Nanua J (2007). Efek darimastitispada mentah kualitas komposisi susu. J Dokter Hewan Sci., 8 (3):237-42.https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.3.237

Olde Riekerink RG, Barkema HW, Stryhn H. (2007). Itu pengaruh musim pada jumlah sel somatik dan kejadian

mastitis klinis. J. Ilmu Susu, 90 (4):1704-15.https://doi.org/10.3168/jds.2006-567

Päivi Rajala-Schultz, Ane N, Tariq H, Karin PW (2021). Penggunaan Antibiotik Secara Bijaksana pada Sapi Perah: Pendekatan Nordik terhadap kesehatan Ambing. Depan. Dokter hewan. Sains, volume 8, 1-7. Detik. Dokter hewan. Epidemiol. ekonomi.https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623998.

Petrie A., Watson P. (1999). Statistika Kedokteran Hewan dan Peternakan Sains." 1stEd., hlm. 90-99, The Blackwell Science Ltd, Inggris Raya.

Piepers S., K. Deberdt, A. DeVisscher, J. Verbeke, S. De Vliegher (2012). Respon imunologis terhadap inokulasi intramammary eksperimental dengan pembunuhan*Stafilokokus aureus* strain pada sapi perah laktasi yang divaksinasi dan tidak divaksinasi. Kongres Buiatrik Dunia. 5 Juni, Lisbon, Portugal. Halaman 8-11.https://doi.org/10.3920/978-90-8686-742-4_68

Piepers S., A. Prenafeta, J. Verbeke, A. De Visscher, Ricard Maret, S.De Vliegher (2016). Respon imun setelah tantangan intramammary eksperimental dengan pembunuhan *Stafilokokus aureus*pada sapi dan sapi dara yang divaksinasi dan tidak divaksinasi dengan Startvac, vaksin mastitis polivalen J. Dairy Sci. 100:769–782https://doi.org/10.3168/jds.2016-11269© American Dairy Science Association®,

Quinn PJ, Carter ME, Markey,BK, Carter GR (1994). Mikrobiologi veteriner klinis." Buku tahun Mosby Eropa terbatas, lynton House, London, PP. 109-126.

Ramanauskienė J., Sederevičius A., Aniulis E., Rudejevienė J., Želvytė R., Monkevičienė I., Laugalis J., Kabašinskienė A., Makauskas S. dan Savickis S. Karvių klinikinio mastito gydymo efektyvumo tyrimai (2008): Vet Med Zoot.. T. 41 (63). Hal.80−85.

Schlegelová J, Babák V, Klímová E, Lukásová J, Navrátilová P, Sustácková A, Sedivá I, dan Rysánek D. (2002): Prevalensi dan resistensi terhadap obat antimikroba pada spesies mikroba terpilih yang diisolasi dari sampel susu curah. J Vet Med B Menular Dis Vet Kesehatan Masyarakat, 49 (5): 216-25. https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00520.x Schukken

YH, V. Bronzo, C. Locatelli, C. Pollera, N. Rota, A. Casula, F. Testa, L. Scaccabarozzi, R. March, D. Zalduendo, R. Guix, P. Moroni. (2014). Kemanjuran vaksinasi pada*Stafilokokus aureus*dan dinamika infeksi intramammary stafilokokus koagulase-negatif di 2 peternakan sapi perah. J. Ilmu Susu. 97: 5250-5264.https://doi.org/10.3168/jds.2014-8008

Tomita GM, Todhunter DA, Hogan JS, Smith KL (1995). Imunisasi sapi perah dengan*Escherichia coli*Vaksin lipopolisakarida J5. J. Ilmu Susu, 78 (10): 2178-2185 https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76845-X.

Tomita GM, Nickerson SC, Owens WE, Gelatik B. (1998). "Pengaruh rute pemberian vaksin terhadap infeksi intramammary eksperimental yang disebabkan oleh *Escherichia coli*. J. Ilmu Susu, 81 (8): 2159-64.https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75793-5

Tomita GM, Ray CH, Nickerson SC, Owens WE, Gallo GF (2000). Perbandingan dua yang tersedia secara komersial *Escherichia coli*Vaksin J5 melawan*E.coli*tantangan intramammary. J. Ilmu Susu, 83 (10): 2276-2281.https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75112-5

Vincent H, Christophe G, Guillaume T, Maryline R, Laurine F, Christian T, Florence B.Gilbert, Edouard G, Céline B, Christophe S, David GESmith, Pierre G, Gilles F, Pascal R (2017). Imunisasi lokal berdampak pada respon sapi perah terhadap penyakit tersebut*Escherichia coli*mastitis. Ilmiah. Rep.volume 7, Nomor artikel: 3441https://doi.org/10.1038/s41598-017- 03724-7

Wilmar C, Julius B, Jochen B, Lena H, Norbert R, Laura P, Dominik S, Kerstin S, Guillermo Martinez-de-Tejada, Klaus B,Thomas G (2019). Inaktivasi Bakteri dengan*γ*-Iradiasi untuk Menyelidiki Interaksi dengan Peptida Antimikroba. Biofisika. J., 117 (10): 1805–1819. Diterbitkan online 2019 18 Oktober.https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.012

Yifan Z, Ralf M, Sophia T, Barbora D, Georgios A, Nicolas M, David D, Alexander M (2018). *Geobacillus* Dan*Basil*Inaktivasi Spora dengan Teknologi Berkas Elektron Energi Rendah: Faktor Resistensi dan Pengaruhnya Mikrobiol Depan., 9: 2720. Diterbitkan online 23 Nov 2018.https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02720

Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, dan Schukken YH.(2011). Epidemiologi molekuler patogen mastitis pada sapi perah dan relevansi komparatifnya dengan manusia. J. Biol Kelenjar Susu. Neoplasia., 16 (4):357-72 https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y.

Zuhair BI (2017). Vaksinasi mastitis pada sapi perah: Terbaru perkembangan dan rekomendasi penerapan. Dokter hewan. Dunia., 10 (9): 1057–1062. Diterbitkan online 2017 12 September. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1057-1062

animal

MDPI

Artikel

Penilaian Fungsi Luteal Menggunakan Palpasi Rektal, Ultrasonografi B-Mode, dan Penentuan Progesteron untuk Meningkatkan Seleksi Penerima dalam Program Transfer Embrio

UxSayaayAñez[1], MHainica Barrio[2], Ismael PakisAndez[2], Juan J.Becerra[1], Pedro G.HerradHaiN[1], Ana I. Peña[1] dan Luis A. Quintela[1,*]

[1] Unit Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Patologi Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Kampus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, Avda. Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spanyol; uxia.yanez.ramil@usc.es (UY); juanjose.becerra@usc.es (JJB); garcia.herradon@usc.es (PGH); ana.pena@usc.es (AIP)

[2] Xyaitunese ETE, Barreiros, Sedes, 15596 NarHain, Spanyol; monica@xenese-ete.com (MB); ismael@xenese-ete.com (JIKA)

* Korespondensi: luisangel.quintela@usc.es

Ringkasan Sederhana: Pemilihan penerima memainkan peran penting dalam program transfer embrio (ET). Selain menilai kesehatan dan status reproduksi hewan, seleksi ini biasanya dilakukan dengan menilai fungsi luteal. Palpasi rektal (RP), ultrasonografi (US), dan penentuan progesteron (P4) adalah teknik utama yang digunakan dalam praktik rutin. Oleh karena itu, kami bertujuan untuk memastikan apakah USG dan P4 menawarkan keuntungan dibandingkan dengan RP dalam hal memilih penerima dengan peluang lebih tinggi untuk mempertahankan kehamilan, dan untuk menentukan apakah volume CL dalam ovarium (%CLOV) dan keberadaan rongga dalam ovarium baik. prediktor hasil ET. Hasil kami menunjukkan bahwa RP dan US merupakan teknik yang berguna untuk memilih penerima. Mengenai tingkat kehamilan, kami hanya mengamati pengaruh yang signifikan secara statistik pada dokter hewan yang melakukan ET. Oleh karena itu, tidak satu pun pengukuran CL yang diteliti merupakan indikator yang baik untuk tingkat kehamilan setelah prosedur ET.

Abstrak: Pemilihan penerima yang tepat menentukan keberhasilan program transfer embrio (ET). Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk menilai keakuratan palpasi rektal (RP) dalam memilih penerima berdasarkan ukuran dan kekerasan korpus luteum (CL) dibandingkan dengan ultrasonografi (US) dan penentuan progesteron (P4); untuk memeriksa apakah US atau P4 memberikan informasi tambahan kepada RP sehubungan dengan pemilihan hewan yang memiliki peluang lebih tinggi untuk mempertahankan kebuntingan; dan untuk memverifikasi keandalan keberadaan rongga dan volume CL dalam ovarium (%CLOV) sebagai prediktor hasil ET. Dalam Eksperimen 1, pengukuran diameter terbesar dan minor (LADCL dan MIDCL), luas CL, dan P4 pada hari ET dikumpulkan, serta skor RP, pada 94 ekor sapi dara. Dalam Eksperimen 2, pengukuran LADCL, MIDCL, volume CL,% CLOV, dan keberadaan rongga dikumpulkan, serta data tentang prosedur dan penanda metabolik, pada 108 ekor sapi dara. Tidak ada perbedaan yang ditemukan pada Percobaan 1, sedangkan pada Percobaan 2 hanya terdapat kecenderungan yang terlihat pada variabel dokter hewan. Akibatnya, hasil ini menunjukkan bahwa RP dan US adalah metode yang berguna untuk memilih penerima, bahwa US dan P4 tidak menawarkan data tambahan untuk digunakan dalam memilih hewan dengan peluang lebih tinggi untuk mempertahankan kebuntingan, dan bahwa baik %CLOV maupun CL kavitasi bukanlah indikator yang baik untuk angka kehamilan.

Kata kunci:transfer embrio; korpus luteum; USG; palpasi rektal; progesteron; sapi betina

check for updates

Kutipan:Yáñez, U.; Barrio, M.; Fernández, I.; Becerra, JJ; Herradón, PG; Pena, AI; Quintela, LA Penilaian Fungsi Luteal Menggunakan Palpasi Rektal, B-Mode Ultrasonografi, dan Penentuan Progesteron untuk Meningkatkan Seleksi Penerima dalam Transfer Embrio Program.*Hewan***2023**,*13*, 2865.https://doi.org/10.3390/ani13182865

Editor Akademik: Olimpia Barbato dan Vittoria Lucia Barile

Diterima: 4 Juli 2023 Revisi: 6 September 2023 Diterima: 7 September 2023 Diterbitkan: 9 September 2023

Hak cipta:© 2023 oleh penulis. Pemegang Lisensi MDPI, Basel, Swiss. Artikel ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan lisensi Creative Commons Attribution (CC BY) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Perkenalan

Transfer embrio (ET) adalah teknik yang paling luas di dunia untuk memperbanyak genetika elit dengan cepat [1]. Meskipun praktik ET pada sapi telah digunakan secara komersial selama beberapa dekade, perbaikan teknik dan hasil kebuntingan tetap menjadi topik penelitian [2,3].

Dalam hal ini, telah dinyatakan bahwa meskipun banyak kemajuan yang menjadikan ET sebagai prosedur rutin di banyak lingkungan pertanian, prosesnya masih belum sempurna [4].

Penting untuk dicatat bahwa keberhasilan program ET dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya pemilihan penerima yang tepat memainkan peran penting [5,6]. Kriteria seperti paritas, usia, skor kondisi tubuh (BCS), status reproduksi, dan status kesehatan digunakan untuk mengkategorikan penerima daging sapi dan susu [1,6]. Di satu sisi, ada beberapa keuntungan menggunakan sapi dara sebagai penerima. Fakta bahwa kemungkinan masalah reproduksi yang disebabkan oleh kehamilan sebelumnya dapat dihindari, serta rahim yang kecil dan mudah dimanipulasi, memfasilitasi pencapaian tingkat kehamilan yang baik [1,6]. Namun, sapi dara lebih rentan menderita distosia saat melahirkan [1]. Di sisi lain, ET transservikal lebih mudah dilakukan pada sapi yang sudah beranak, dengan tingkat kebuntingan yang dapat diterima dan lebih mudah untuk melahirkan. Namun kesuburan hewan ini dipengaruhi oleh faktor lain seperti keseimbangan energi negatif, produksi susu yang tinggi, dan patologi pascapersalinan [7]. Dalam semua kasus, penting untuk mengambil semua tindakan sanitasi yang mungkin dilakukan untuk menghindari segala jenis kehilangan embrio atau aborsi dan untuk menetapkan program vaksinasi terhadap penyakit potensial yang ada di kandang atau di area tersebut [1].

Dalam kondisi seperti ini, memiliki jumlah penerima yang cukup dan sesuai untuk transfer merupakan faktor pembatas bagi pengembangan teknik ini, terutama di peternakan kecil. Oleh karena itu, penggunaan penerima tersebut perlu dimaksimalkan agar dapat hamil dalam waktu sesingkat-singkatnya. Saat memulai proses seleksi penerima, kemampuan mereka untuk menunjukkan estrus dalam periode yang diinginkan harus diperhitungkan baik dengan mendeteksi estrus alami atau dengan menggunakan metode sinkronisasi ovulasi untuk ET waktu tetap [8]. Hal penting lainnya yang perlu dipertimbangkan adalah kemampuan penerima untuk berovulasi dan membentuk korpus luteum (CL) fungsional yang mampu memproduksi progesteron dalam waktu yang cukup dan dalam jumlah yang cukup untuk bekerja pada reseptor progesteron di rahim, sehingga mengubah pola produksi. sekresi uterus yang diperlukan untuk mendukung perkembangan dan pemeliharaan embrio [5,9–11]. Hanya pada tahap luteal dari siklus estrus lingkungan mikro uterus menyediakan media yang memadai bagi embrio untuk berkembang. Akibatnya, harmonisasi keadaan fisiologis donor dan penerima dalam prosedur ET meletakkan dasar bagi keberhasilannya [12].

Perlu dicatat bahwa pengukuran konsentrasi progesteron plasma pada hari ET dapat digunakan untuk mengidentifikasi CL aktif atau tidak aktif. Namun, prosedur ini mahal dan memakan waktu [8]. Di peternakan, fungsi CL secara tradisional dinilai dengan palpasi rektal (RP), mengevaluasi ukuran dan integritas CL [13]. Selain itu, ultrasonografi mode B juga telah digunakan untuk tujuan ini, dengan mempertimbangkan pengukuran CL, seperti area CL, sebagai indikator fungsi [14]. Baru-baru ini, ultrasonografi Doppler warna telah dipelajari sebagai pendekatan baru untuk penilaian fungsionalitas CL, dan menunjukkan hasil yang menjanjikan [5,15,16]. Namun, dalam praktik sehari-hari, sebagian besar dokter hewan menggunakan ultrasonografi mode RP atau B, karena ultrasonografi Doppler belum tersedia di sebagian besar peralatan ultrasonografi.

Telah dinyatakan bahwa memilih penerima berdasarkan kadar progesteron atau fungsi CL kemungkinan besar akan meningkatkan kemungkinan implantasi dan kehamilan setelah ET [17]. Oleh karena itu, memilih penerima berdasarkan pengukuran CL mungkin merupakan strategi yang efisien untuk meningkatkan hasil ET. Beberapa karakteristik CL telah dipelajari untuk menentukan fungsi CL dan memprediksi tingkat kehamilan pada penerima, seperti konsistensi CL, diameter, luas, volume, keberadaan rongga, tekstur gema, dan aliran darah [5,8,11,13,18]. Namun, hasil kontroversial telah dilaporkan mengenai indikator mana yang terbaik atau apakah mungkin untuk memprediksi tingkat kehamilan berdasarkan karakteristik CL.

Selain itu, meskipun telah dilaporkan bahwa produksi progesteron dan respons terhadap pengobatan prostaglandin tidak berbeda antara CL kavitasi dan kompak [19,20], hasil yang berbeda diperoleh mengenai hasil kehamilan. Beberapa penulis menggambarkan penurunan kemampuan mempertahankan kebuntingan pada sapi dengan CL kavitasi.21], sementara yang lain

menganggap CL kavitas sebagai indikator kemungkinan potensi lebih tinggi dari penerima dalam mempertahankan kehamilan [18].

Akibatnya, penelitian tambahan diperlukan untuk memverifikasi efek CL kavitasi pada pelestarian kehamilan setelah ET. Selain itu, sepengetahuan kami, kemungkinan pengaruh volume CL dalam kaitannya dengan volume ovarium total (%CLOV) terhadap pemilihan penerima dan tingkat kehamilan belum dievaluasi. Oleh karena itu, dua percobaan dilakukan untuk mencapai tujuan penelitian ini. Dalam Eksperimen 1, tujuannya adalah untuk menilai keakuratan RP dalam memilih penerima berdasarkan ukuran dan kekencangan CL dibandingkan dengan ultrasonografi mode B (US) dan penentuan serum progesteron (P4); tujuan kedua adalah untuk memeriksa apakah US atau P4 memberikan informasi tambahan kepada RP untuk memilih hewan dengan peluang lebih tinggi untuk mempertahankan kebuntingan. Dalam Eksperimen 2, tujuannya adalah untuk memeriksa keandalan keberadaan rongga dan% CLOV sebagai prediktor hasil ET.

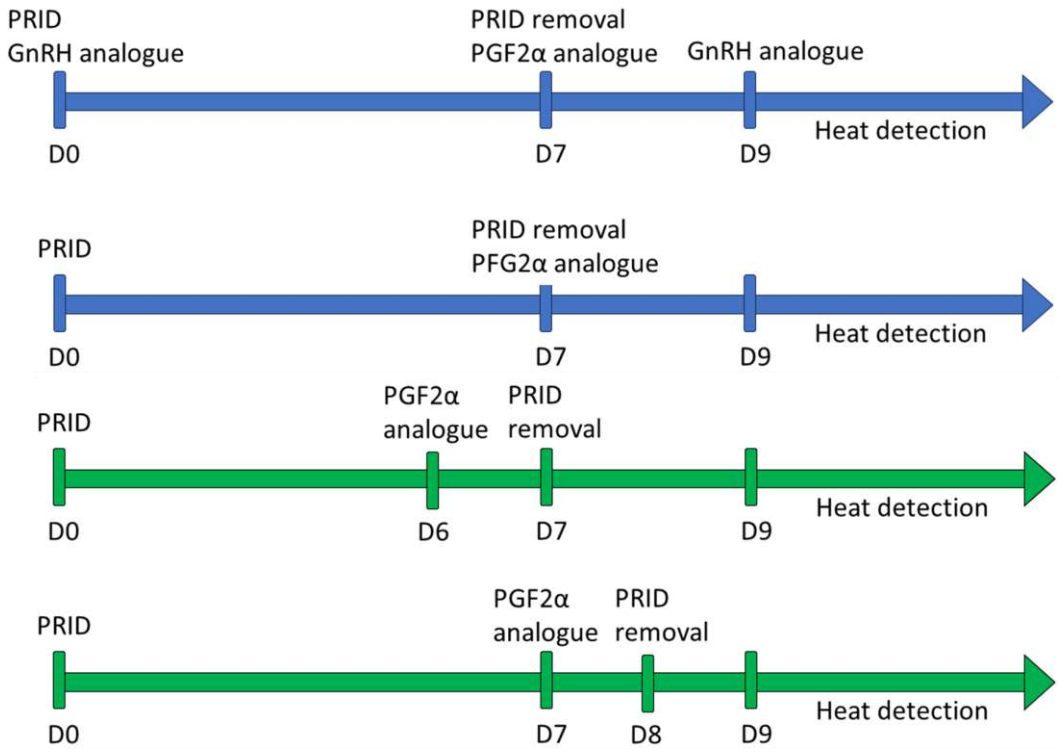
2. Bahan-bahan dan metode-metode

2.1. Hewan

Dalam Eksperimen 1, 94 ekor sapi dara Holstein berumur 15-17 bulan dilibatkan dalam penelitian ini. Hewan-hewan tersebut berasal dari 7 peternakan di Galicia (Spanyol) dan ditempatkan di fasilitas kandang gratis di bawah manajemen intensif. Dalam Eksperimen 2, digunakan 108 ekor sapi dara Holstein berumur 14-18 bulan. Hewan-hewan tersebut berasal dari 2 pusat penangkaran dari Galicia (Spanyol) dan ditempatkan di fasilitas kandang gratis di bawah manajemen intensif. Pada kedua percobaan, sapi dara dipilih sebagai penerima berdasarkan umurnya (>13 bulan), status kesehatan (negatif terhadap IBR, BVD, dan*Neospora*), kesehatan reproduksi, dan BCS (2,75–3,5 pada skala 1–5). Embrio yang ditransfer diperoleh secara in vivo dari sapi Holstein dengan nilai genetik tinggi dan semuanya diberi skor Kualitas 1 menurut klasifikasi IETS [22]. Prosedur non-bedah untuk ET digunakan, mengikuti langkah-langkah yang sama seperti pada praktik biasa. Embrio dipindahkan segar setelah evaluasi, atau dicairkan setelah kriopreservasi, mengikuti protokol yang memadai (lihat prosedur ET di bawah). Dalam Eksperimen 1, hanya embrio beku yang menggunakan kriopreservan Etilen Glikol yang digunakan, sedangkan pada Eksperimen 2, embrio segar dan beku dengan Etilen Glikol dan Gliserol yang digunakan. Kedua eksperimen tersebut dilakukan sesuai dengan Peraturan Eropa dan Spanyol untuk perlindungan hewan yang digunakan untuk tujuan ilmiah (Directive 2010/63/EU, RD 53/2013).

2.2. Protokol Sinkronisasi

Dalam Eksperimen 1, dua protokol sinkronisasi berbeda digunakan (Gambar1), memastikan bahwa protokol yang sama diterapkan pada peternakan dan kelompok sapi dara yang sama. Protokol pertama terdiri dari pengenalan alat pelepas progesteron intravaginal 1,55 g (PRID® DELTA, Ceva SantyaituAnimale, Libourne, Perancis) dan administrasi 50mikrog lecirelin analog GnRH (Dalmarelin, Fatro Ibyaiturica, Barcelona, Spanyol) pada Hari ke 0, pelepasan alat progesteron dan pemberian 0,15 mg D-cloprostenol (Dalmazin, Fatro Ibyaiturica, Barcelona, Spanyol) pada Hari ke 7, administrasi ke-50mikrog lecirelin pada Hari ke 9, dan deteksi panas setelahnya. Protokol kedua terdiri dari pengenalan alat pelepas progesteron intravaginal pada Hari ke-0, pelepasan alat dan pemberian D-cloprostenol pada Hari ke-7, dan deteksi panas mulai Hari ke-9 dan seterusnya. Kemungkinan pengaruh protokol sinkronisasi ini terhadap persentase penerima yang cocok untuk ET atau pada tingkat kebuntingan berikutnya telah dipelajari sebelumnya oleh kelompok kami (data tidak dipublikasikan) dan diamati bahwa kedua protokol tersebut efektif untuk sinkronisasi panas pada sapi dara.



Angka 1. Skema s dari protokol sinkronisasi berbeda yang diikuti dalam Eksperimen 1 (biru) dan Eksperimen 2 (hijau) untuk menyinkronkan masing-masing 94 dan 108 sapi dara Holstein sebagai penerima transfer embrio.

Dalam Eksperimen 2, dua protokol sinkronisasi berbeda juga digunakan (Gambar 1). Protokol pertama terdiri dari langkah-langkah berikut: Hari ke-0, alat pelepas progesteron intravaginal 1,55 g (PRID®DELTA, Ceva SantyaituAnimale, Libourne, Perancis) diperkenalkan; Hari ke 6, 0,15 mg D-cloprostenol diberikan; perangkat progesteron dilepas pada Hari ke 7; dan deteksi panas dilakukan mulai Hari ke 9 dan seterusnya (PRID7PG6). Protokol kedua hampir tidak ada bedanya, satu-satunya perbedaan adalah D-cloprostenol diberikan pada Hari ke 7, dan perangkat progesteron dilepas pada Hari ke 8 (PRID8PG7).

2.3. Recipient Seleksi

Dalam Eksperimen 1, sapi dara dieksplorasi dengan palpasi rektal dan ultrasonografi tujuh hari setelah timbulnya panas. Palpasi rektal dilakukan oleh dua orang yang berpengalaman dokter hewan dengan the kriteria seleksi yang sama. Metode evaluasi didasarkan pada hal tersebut dijelaskan oleh Zemjan pada tahun 1970 [23], yang mengklasifikasikan CL menurut ukuran, tekstur, dan kekencangannya (Tabel 1). H ifers tanpa struktur luteal diklasifikasikan sebagai "tidak adanya CL".

Tabel 1. Klasifikasi Corpus luteum (CL) diikuti untuk memilih 94 ekor sapi dara Hol tein sebagai penerima prosedur transfer embrio. Palpasi rektal dilakukan tujuh hari setelah timbulnya panas, mengikuti protokol sinkronisasi panas (Diadaptasi dari Zemjanis, 1970 [23]).

Klasifikasi CL	Hari o siklus	Keterangan
Tidak adanya korpus luteum	1–2	Folikel yang runtuh
Badan hemoragik 1 (HB1)	2–3	Lembut, gembur, mengembangkan CL, <1 cm
Badan hemoragik 2 (HB2)	3–5	CL lembut, 1–2 cm
Badan hemoragik 3 (HB3)	6–7	CL konsisten, >2 cm, masih mobile, dengan mahkota teraba
Korpus luteum 3 (CL3)	8–17	CL besar dan kokoh, mahkota terintegrasi ke dalam ovarium
Korpus luteum 2 (CL2)	18–20	CL keras, dalam regresi
Korpus luteum 1 (CL1)	20–21	CL sangat keras, <1 cm

Sapi dara dengan tubuh hemoragik yang diklasifikasikan sebagai HB3 dipilih dan sisi HB ditandai untuk memungkinkan perpindahan lebih cepat dan mudah setelah embrio dicairkan. Selanjutnya, pemindaian ultrasonografi ovarium dilakukan. Pemindaian PieMedical Tringa (Esaote, Genoa, Italia), dilengkapi dengan transduser array linier 5,0 MHz, digunakan. Didapatkan pengukuran diameter CL terbesar (LADCL), diameter kecil CL (MIDCL), dan luas CL (CLA).

Dalam Percobaan 2, sapi dara dieksplorasi dengan palpasi rektal dan ultrasonografi pada hari ke 7 setelah timbulnya panas. Pemindaian HS-1500 (Honda Electronics Co., Ltd., Aichi, Jepang), dilengkapi dengan transduser array linier 7,5 MHz, digunakan. Sapi dara dengan diameter CL > 18 mm dilibatkan dalam penelitian ini (n = 97). Untuk setiap sapi dara yang dipilih, pemindaian ovarium secara rinci dilakukan, dan pengukuran LADCL, MIDCL, diameter ovarium terbesar (LADOV), dan diameter ovarium kecil (MIDOV) diperoleh. Volume CL (VOLCL) dihitung dengan asumsi bola sempurna, menggunakan rumus:

$$V = 4/3\pi r^3$$

Jika terdapat rongga, volume rongga dihitung menggunakan rumus yang sama dan dikurangi dari total volume CL. Selain itu, volume ovarium (VOLOV) dihitung menggunakan rumus:

$$V = \pi \frac{4}{3} abc$$

dimana a, b, dan c masing-masing berhubungan dengan tinggi, lebar, dan panjang ovarium. Akhirnya, persentase ovarium yang berhubungan dengan CL (%CLOV) dihitung.

2.4. Pengumpulan dan Analisis Sampel Darah

Setelah pemeriksaan penerima selesai, sampel darah dikumpulkan dari vena tulang ekor menggunakan tabung vakum tanpa antikoagulan pada kedua percobaan. Sampel disimpan dalam lemari es selama maksimal 6 jam, dan serum dipisahkan setelah sentrifugasi pada suhu 1500.×*G*selama 30 menit ke dalam 0,5 mL alikuot dan disimpan pada-18◦C sampai analisis.

Konsentrasi serum progesteron (P4) diukur dalam kedua percobaan dengan kit ELISA progesteron komersial (Progesteron ELISA EIA-1561, DRG Instruments GmbH, Marburg, Jerman) mengikuti instruksi pabrik. Penentuan dilakukan dua kali untuk setiap sampel, dan nilai rata-rata antara kedua pengukuran digunakan. Batas deteksi untuk P4 berkisar antara 0 hingga 40 ng/mL, dengan sensitivitas analitik 0,045 ng/mL. Kepadatan optik diukur dalam microplate reader (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Dalam Eksperimen 2, konsentrasi indikator biokimia tambahan dinilai. Semua analisis dilakukan dengan menggunakan fotometer digital (Selecta MD200, Barcelona, Spanyol), kecuali untuk analisis protein total, yang menggunakan refraktometer portabel (JP SELECTA SA, Abrera, Barcelona, Spanyol). Konsentrasi glukosa, kolesterol total, trigliserida, dan albumin ditentukan dengan metode titik akhir kolorimetri (BioSystems SA, Barcelona, Spanyol). Enzim hati alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), dan gamma-glutamyltransferase (GGT) ditentukan dengan menggunakan reagen BioSystems. Urea juga dianalisis melalui metode enzimatik kolorimetri dengan reagen Spinreact (Spinreact, SAU, Sant Esteve de Bas, Spanyol). Asam lemak non-esterifikasi (NEFA) dan asam β-hidroksibutirat (BHBA) ditentukan dengan peralatan enzim kinetik (Randox Laboratories Ltd., Antrim, UK).

2.5. Prosedur Transfer Embrio

Setelah penerima dipilih, mereka bersiap untuk transfer mengikuti prosedur non-bedah di kedua percobaan. ET dilakukan oleh salah satu dokter hewan berpengalaman pada Eksperimen 1, sedangkan pada Eksperimen 2, prosedurnya dilakukan oleh

2 dokter hewan yang berbeda dan berpengalaman. Pertama, hewan dibius menggunakan 6-10 mg xylazine (Rompun 20 mg/mL, Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Jerman). Kemudian, pemberian prokain 80 mg secara epidural (Pronestesic 40 mg/mL, Fatro Iberica, Barcelona, Spanyol) dilakukan untuk melumpuhkan sapi sebanyak mungkin untuk menghindari cedera pada endometrium selama pemindahan. Selain itu, dalam Eksperimen 2, 500 mg agen antiinflamasi flunixin meglumine (Finadyne 50 mg/mL, Merck Sharp & Dohme Animal Health, SL, Kenilworth, NJ, USA) diberikan secara intramuskular (n = 9) untuk menghindari pelepasan endogen prostaglandin sebagai konsekuensi dari transfer. Terakhir, seluruh area perivulva diseka dengan kertas untuk menghindari kontaminasi ke dalam vagina dan rahim.

Setelah pengumpulan/pencairan embrio (Tabel S1), jerami ditempatkan ke dalam batang Cassou berdiameter 3 mm (Minitub Iberica SL, Tarragona, Spanyol). Batang ditutup dengan selubung steril dengan ujung baja dan lubang samping, dan dilindungi dengan selongsong sanitasi plastik (Chemise Sanitaire, IMV Technologies, L'Aigle, France). Setelah batang dimasukkan ke dalam serviks, selongsong sanitasi ditarik kembali dan batang dimasukkan ke dalam rahim di tengah-tengah tanduk rahim ipsilateral ke ovarium dengan CL, di mana embrio ditempatkan dengan lancar. Diagnosis kebuntingan dilakukan 30-40 hari setelah transfer embrio menggunakan ultrasonografi, dan sapi penerima diklasifikasikan bunting atau tidak bunting.

2.6. Analisis statistik

Dalam Eksperimen 1, kadar P4 serum, LADCL, MIDCL, dan CLA dianggap sebagai variabel kontinu, dan klasifikasi palpasi rektal CL (RPCL) dianggap sebagai variabel kategori, diklasifikasikan seperti yang ditunjukkan pada Tabel1. Pertama, analisis korelasi Pearson dilakukan termasuk kadar P4 serum, LADCL, MIDCL, dan CLA. Untuk membandingkan RPCL, dilakukan uji Oneway ANOVA menggunakan alat general linear model (GLM), yang memasukkan serum P4, LADCL, MIDCL, dan CLA sebagai variabel terikat, dan RPCL sebagai faktor. Uji HSD Tukey digunakan untuk memeriksa perbedaan signifikan antara struktur ovarium, dan homogenitas varian diperiksa menggunakan uji Levene.

Selain itu, pengaruh palpasi rektal, ultrasonografi, dan pengukuran progesteron terhadap hasil ET juga diuji. Uji Oneway ANOVA dilakukan dengan menggunakan alat GLM, dengan memasukkan kehamilan sebagai variabel bebas dan serum P4, LADCL, MIDCL, dan CLA sebagai variabel terikat.

Dalam Eksperimen 2, berikut ini dianggap sebagai variabel kontinu: LADCL, MIDCL, LADOV, MIDOV, VOLCL, %CLOV, serum P4, BCS, glukosa, kolesterol total, trigliserida, albumin, total protein, ALAT, ASAT, GGT, urea, BHB, dan NEFA. Sedangkan untuk variabel kategori dipertimbangkan sebagai berikut: hamil (YA/TIDAK), rongga CL (YA/TIDAK), pemberian flunixin meglumine (YA/TIDAK), jenis embrio (Etilen glikol, gliserol, segar), dokter hewan yang melakukan transfer (n◦1/n◦2), dan protokol sinkronisasi (PRID7PG6/PRID8PG7). Kami menentukan kontribusi relatif masing-masing faktor terhadap kemungkinan kehamilan menggunakan regresi logistik biner bertahap mundur. Kami memasukkan outcome kehamilan sebagai variabel dependen dan variabel lainnya sebagai faktor independen.

Semua analisis dilakukan dalam SPSS versi 28.0 untuk Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Perbedaan dianggap signifikan pada $P \leq 0{,}05$.

3. Hasil

3.1. Eksperimen 1

Dari 94 penerima yang dievaluasi untuk ET, 51 dipilih berdasarkan kriteria palpasi rektal, yaitu adanya HB3 di ovarium. Data dari 94 hewan digunakan untuk menilai korelasi antara berbagai teknik yang digunakan untuk mengevaluasi CL. Di sisi lain, dari 51 hewan yang dipilih untuk dipindahkan, 2 ekor sapi dara dikeluarkan karena kehilangan data. Oleh karena itu, data dari 49 ekor sapi dara terpilih digunakan untuk menguji pengaruh pengukuran yang diperoleh terhadap hasil ET. Angka kehamilan pada percobaan ini adalah 44,9%.

Hasil analisis korelasi Pearson menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif dan signifikan secara statistik antara konsentrasi P4 serum, CLA, dan MIDCL (Tabel2).

Meja 2. Hasil analisis korelasi Pearson terhadap 94 ekor sapi dara Holstein, untuk variabel konsentrasi serum progesteron (serum P4), area corpus luteum (CLA), diameter CL terbesar (LADCL), dan diameter CL kecil (MIDCL).

	Serum P4	PKL	LADCL	TENGAH CL
Serum P4	1	0,335**	0,189	0,368**
PKL	-	1	0,758**	0,799**
LADCL	-	-	1	0,511**
TENGAH CL	-	-	-	1

* *P*≤0,01.

Mengenai RPCL, tidak ada pengamatan yang dilakukan untuk HB1 dan CL1, yaitu tidak ada hewan yang termasuk dalam penelitian yang menunjukkan struktur ini di ovariumnya. Hasil untuk Oneway ANOVA ditampilkan pada Tabel3.

Tabel 3. Hasil uji Oneway ANOVA terhadap 94 ekor sapi dara Holstein untuk variabel konsentrasi serum progesteron (Serum P4), area corpus luteum (CLA), diameter CL terbesar (LADCL), dan diameter CL kecil (MIDCL) menurut klasifikasi struktur luteal yang ada di ovarium, dievaluasi melalui palpasi rektal (Zemjanis, 1970 [23]): badan hemoragik 2 (HB2), badan hemoragik 3 (HB3), korpus luteum 3 (CL3), dan korpus luteum 2 (CL2).

	N	Serum P4 (ng/mL)	KLA (cm^2)	LADCL (cm)	TENGAH CL (cm)
Absennya CL	7	2.17±1,99A	-	-	-
HB2	14	7.67±5.70ab	3.04±1.10A	2.39±0,46A	1.53±0,29A
HB3	51	7.81±4.37B	4.16±1.02B	2.81±0,43B	1.90±0,32B
CL3	15	7.52±6.14ab	3.49±1.01ab	2.66±0,67ab	1.72±0,36ab
CL2	7	3.84±2.98ab	2.54±1.03A	2.27±0,51ab	1.35±0,29A

a,bHuruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik pada kolom yang sama.

Mengenai pengaruh terhadap tingkat kebuntingan, uji Oneway ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik antara sapi dara bunting dan tidak bunting sehubungan dengan variabel yang dinilai (Tabel4).

Tabel 4. Hasil uji Oneway ANOVA terhadap 49 ekor sapi dara Holstein untuk variabel konsentrasi serum progesteron (Serum P4), area korpus luteum (CLA), diameter CL terbesar (LADCL), dan diameter CL kecil (MIDCL) menurut diagnosis kehamilan 30-40 hari setelah prosedur transfer embrio: negatif (TIDAK) atau positif (YA).

Kehamilan	N	Serum P4 (ng/mL)	PKL (cm^2)	LADCL (cm)	TENGAH CL (cm)
TIDAK	27	9.02±8.31	3.92±1.19	2.74±0,42	1.87±0,35
YA	22	9.54±7.16	4.36±1,00	2.93±0,48	1.92±0,33

3.2. Eksperimen 2

Dari 108 ekor sapi dara yang dievaluasi pada awalnya, 97 ekor akhirnya diikutsertakan dalam penelitian sebagai penerima. Dari 97 ekor sapi dara ini, 3 ekor mempunyai dua CL, dan dikeluarkan dari penelitian. Akibatnya, jumlah hewan yang dimasukkan adalah 94, dimana 67 hewan bunting setelah ET, dan 27 hewan tidak bunting (angka kebuntingan = 69%).

Hasil regresi logistik biner menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara sapi dara bunting dan tidak bunting terkait dengan variabel yang dimasukkan dalam model, kecuali kadar progesteron yang lebih tinggi pada dua ekor hewan yang melahirkan.

(ATAU = 2,476, *hal* =0,06; Tabel5Dan6). Uji Hosmer dan Lemeshow tidak signifikan (*hal* = 0,799), dan signifikansi model secara keseluruhan adalah *P*=0,05.

Tabel 5. Statistik deskriptif (rata-rata±deviasi standar) Eksperimen 2 untuk diameter terbesar korpus luteum (LADCL), diameter kecil CL (MIDCL), volume CL, persentase ovarium yang sesuai dengan CL (%CLOV), konsentrasi serum progesteron (Serum P4), skor kondisi tubuh (BCS), glukosa, kolesterol total, albumin, protein total, trigliserida, ALAT, ASAT, GGT, urea, BHB, dan NEFA dari 94 ekor sapi dara menurut diagnosis kebuntingannya setelah transfer embrio.

Variabel	Hamil (n = 67)	Tidak Hamil (n = 27)
LADCL (mm)	28.55±3.73	27.86±3,95
MIDCL (mm)	18.96±3.93	19.60±3,99
VOLCL (mm^3)	7148.52±3064.74	7165.99±2876.72
%KLOV	48.11±15.71	45.62±11.13
Serum P4 (ng/mL)	16.30±11.89	17.45±13.28
BCS	2.94±0,27	3.03±0,31
Glukosa (mg/dL)	76,85±28.32	76.13±16.35
Kolesterol total (mg/dL)	118.29±43.12	112.22±31.00
Albumin (g/L)	31.82±7.85	30.75±7.34
Jumlah protein (g/L)	62.12±4.27	63.00±7.29
Trigliserida (mg/dL)	54.39±76.03	62.48±87.56
AST (U/L)	116,99±63.54	119.48±60,99
ALT (U/L)	51.92±38.13	49.77±53,97
GGT (U/L)	25.73±7.39	27.21±11.48
Urea (mg/dL)	31.61±10.41	30.21±9.36
BHB (mmol/L)	0,36±0,32	0,32±0,21
NEFA (mmol/L)	0,58±0,81	0,79±1.13

Tabel 6. Statistik deskriptif Eksperimen 2 untuk persentase sapi dara Holstein bunting (n = 94) setelah transfer embrio dengan variabel berikut: adanya corpus luteum (CL) yang berlubang, pemberian flunixin meglumine pada transfer embrio, jenis agen krioprotektan yang digunakan untuk pelestarian embrio, dokter hewan yang melakukan transfer embrio, dan protokol sinkronisasi yang digunakan.

Variabel		N	Sapi dara hamil
CL dengan rongga	YA	33	22/33 (66,7%)
	TIDAK	61	45/61 (73,4%)
Flunixin meglumin	YA	9	5/9 (55,6%)
	TIDAK	85	62/85 (72,9%)
Pelestarian embrio	Etilen glikol	64	44/64 (68,7%)
	Gliserin	17	17/12 (70,6%)
	Segar	13	13/11 (84,6%)
Dokter hewan *	1	48	39/48 (81,2%)
	2	45	27/45 (61,7%)
Sinkronisasi protokol	PRID7PG6	76	55/76 (72,2%)
	PRID8PG7	18	18/12 (66,7%)

* *P*=0,06.

4. Diskusi

Hasil analisis korelasi kami pada Eksperimen 1 menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif dan signifikan secara statistik antara konsentrasi P4 serum dan pengukuran CL seperti CLA dan MIDCL. Akibatnya, B-mode US dapat memberikan informasi yang tepat tentang fungsi CL dan mungkin merupakan alat yang berguna untuk memilih penerima sebelum ET. Temuan ini sesuai dengan pengamatan peneliti lain, yang menyatakan bahwa CLA berkaitan erat dengan konsentrasi P4 dan memiliki hubungan paling besar dengan fungsi luteal selama perkembangan CL [24,25]. Dalam hal ini, penelitian terbaru oleh laboratorium kami [16] menunjukkan bahwa

CLA bisa menjadi parameter pilihan saat menggunakan B-mode US untuk menilai fungsi luteal. Namun, perlu dicatat bahwa Doppler US menjadi lebih populer saat ini, dan banyak penelitian dilakukan untuk menilai keakuratannya sebagai alat manajemen reproduksi [26–29]. Sejauh ini, penelitian telah dilakukan mengenai kegunaan Doppler US untuk menentukan fungsi CL, dan diperoleh hasil yang menjanjikan, terutama mengenai deteksi luteolisis dan diagnosis kehamilan dini [16,30–33]. Sehubungan dengan ET, hubungan antara aliran darah CL dan pemilihan penerima, tingkat kehamilan, dan diagnosis kehamilan dini telah dipelajari, mengamati hasil yang lebih baik pada kasus pertama [5,15,34].

Mengenai RP, hasil analisis Oneway ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara HB3 dan HB2 untuk CLA, LADCL, dan MIDCL. Selain itu, perbedaan juga diamati antara HB3 dan CL2 untuk CLA dan MIDCL. Akhirnya, konsentrasi P4 serum berbeda secara signifikan antara HB3 dan tidak adanya CL. Di sisi lain, tidak ditemukan perbedaan signifikan antara HB3 dan CL3. Karena nilai serupa yang diperoleh untuk HB3 dan CL3 sehubungan dengan pengukuran ukuran dan konsentrasi P4, penentuan US dan P4 tampaknya bukan pendekatan yang tepat untuk membedakan kedua struktur luteal ini, yang terdapat pada hari ke 6 hingga 17 siklus estrus. . Untuk melakukan ET dengan benar, penerima idealnya harus berada sekitar hari ke 7 dari siklus estrus, sesuai dengan usia embrio [35]. Hasil kami menunjukkan bahwa penentuan US dan P4 berguna untuk mengidentifikasi CL yang sedang berkembang (HB1, HB2) atau yang mengalami kemunduran (CL2, CL1), tetapi hanya RP yang memungkinkan kita membedakan antara HB3 dan CL3, dengan menggunakan keteguhan sebagai indikator. usia luteal. Saat siklus estrus berlangsung, CL menjadi lebih kencang dan kompak. Namun, tidak terdapat korelasi yang signifikan, baik antara kekerasannya dengan konsentrasi progesteron pada keadaan dewasa, maupun antara kekerasannya dengan ukuran luteal.24]. Karakteristik ini mungkin dievaluasi menggunakan US dengan mempertimbangkan tekstur gema [36]. Namun demikian, meskipun telah dinyatakan bahwa heterogenitas jaringan luteal dianggap sebagai indikator potensial fungsi CL [14], tidak ada perbedaan signifikan dalam karakteristik ekotekstur CL yang ditemukan antara hari ke 7 dan 18 siklus estrus [37].

Mengenai tingkat kebuntingan, tidak ada perbedaan signifikan secara statistik yang diamati untuk konsentrasi P4 serum, CLA, LADCL, dan MIDCL pada sapi yang dipilih melalui RP, yaitu sapi yang memiliki HB3 di ovarium pada saat ET. Temuan ini menunjukkan bahwa baik penentuan P4 maupun USG tidak memberikan informasi tambahan pada RP yang dapat mengarah pada pemilihan penerima dengan peluang lebih tinggi untuk mempertahankan kehamilan. Namun, perlu dipertimbangkan bahwa ada faktor-faktor tambahan yang mungkin menentukan hasil ET dan dapat digunakan sebagai indikator tingkat kehamilan. Dalam hal ini, Frade dkk. [38] melaporkan bahwa manifestasi perilaku estrus mungkin memiliki hubungan positif dengan tingkat kehamilan pada program ET, yang mungkin disebabkan oleh efek estrogen pada jaringan endometrium. Demikian pula, peneliti lain juga menyatakan bahwa sapi yang menunjukkan estrus memiliki respons ovarium yang lebih baik (folikel lebih besar, CL lebih besar, dan konsentrasi P4 lebih besar) dan hasil kebuntingan lebih baik setelah program inseminasi buatan tepat waktu [39].

Mengenai Eksperimen 2, hasil regresi logistik biner kami menunjukkan bahwa, di antara semua variabel yang diteliti, hanya dokter hewan yang melakukan ET yang cenderung mempengaruhi tingkat kehamilan berikutnya. Telah diterima secara luas bahwa kompetensi praktisi merupakan kunci keberhasilan ET, bersamaan dengan kualitas embrio yang baik dan manajemen penerima [2]. Perlu disebutkan bahwa kedua dokter hewan yang melakukan ET dalam percobaan ini memiliki pengalaman yang signifikan di bidang ini dan tingkat kehamilannya optimal (81,6 dan 61,7%); namun demikian, hasil ini menekankan pentingnya faktor ini dan mengungkapkan keragaman bakat bahkan di antara para profesional yang berkualifikasi.

Di sisi lain, tidak ada pengukuran CL yang menunjukkan perbedaan signifikan antara penerima yang hamil dan tidak hamil. Seperti pada Eksperimen 1, LADCL dan MIDCL tidak berbeda antar kelompok. Demikian pula, baik VOLCL maupun %CLOV, tampaknya bukan merupakan indikator hasil ET yang dapat diandalkan. Seperti disebutkan di atas, keberadaan CL fungsional di ovarium sangat diperlukan untuk memaksimalkan peluang kehamilan setelah ET. Penerima dalam percobaan ini dipilih berdasarkan ukuran CL (LADCL > 18 mm). Oleh karena itu, kurangnya signifikansi dapat dijelaskan oleh fakta bahwa hanya sapi dara

dengan CL fungsional dilibatkan dalam penelitian ini, yaitu ketika ukuran CL melampaui ambang batas tertentu, pengukuran yang lebih tinggi tidak berarti peluang kehamilan yang lebih baik. Efek serupa telah dijelaskan sebelumnya, karena para peneliti mengklaim bahwa, dalam prosedur ET, terdapat hubungan positif antara tingkat kehamilan dan area CL hingga jaringan luteal mencapai ukuran tertentu [5].

Dalam hal CL kavitasi, hasil kami menunjukkan bahwa tingkat kebuntingan tidak berbeda antara sapi dengan CL kavitasi atau homogen, seperti yang dilaporkan sebelumnya oleh Perez-Marin [40]. Diketahui bahwa adanya rongga di dalam CL tidak mempengaruhi produksi progesteron. Namun, hasil berbeda telah dilaporkan mengenai topik ini. Beberapa peneliti menyatakan bahwa keberadaan rongga luteal tidak mempengaruhi produksi progesteron sepanjang siklus estrus lengkap [40], sementara peneliti lain menggambarkan kadar progesteron yang lebih tinggi, dan tingkat kebuntingan yang lebih tinggi, pada sapi dara dengan CL yang berlubang [11,18]. Oleh karena itu, jelas bahwa penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menjelaskan masalah ini dan memperjelas apakah rongga luteal dapat mempengaruhi hasil ET dan inseminasi buatan (AI).

Mengenai jenis pengawetan yang digunakan untuk embrio, kami mengamati tingkat kebuntingan yang lebih tinggi pada kelompok embrio segar. Dalam hal ini, Hansen [4] juga menggambarkan tingkat kebuntingan yang lebih rendah (7,4%) pada sapi yang menerima embrio kriopreservasi dibandingkan sapi yang menerima embrio segar. Namun, tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik dalam penelitian kami sehubungan dengan kelompok etilen glikol dan gliserol terhadap tingkat kehamilan. Salah satu penjelasan yang mungkin adalah kurangnya kekuatan statistik karena rendahnya jumlah sapi dara dalam kelompok segar dan gliserol.

Aspek lain yang perlu dipertimbangkan adalah status metabolisme dan kesehatan penerima. Kami tidak mengamati perbedaan yang signifikan secara statistik mengenai BCS atau indikator metabolik yang dianalisis antara penerima yang hamil dan tidak hamil. Karena faktor peternakan dan pengelolaan, termasuk status penyakit, nutrisi, dan kesehatan reproduksi, memainkan peran penting dalam keberhasilan ET, pemilihan penerima harus mencakup validasi indikator-indikator ini [2,6]. Dalam penelitian kami, pemeriksaan sapi dara sebelumnya dilakukan untuk memilih hewan mana yang akan didaftarkan. Oleh karena itu, besar kemungkinannya, karena hanya sapi dara dengan kondisi kesehatan yang memadai yang dipilih, dampak buruk yang mungkin ditimbulkan oleh masalah nutrisi terhadap tingkat kehamilan telah disaring pada saat ini.

Akhirnya, tidak ada perbedaan signifikan secara statistik yang diamati untuk protokol sinkronisasi dan pemberian flunixin meglumine. Mengenai protokol sinkronisasi, perlu dipertimbangkan bahwa ada beragam protokol yang digunakan untuk ET dalam literatur. Dengan cara ini, protokol termasuk perangkat pelepasan progesteron, seperti yang ada dalam penelitian kami, bekerja dengan baik untuk menyinkronkan panas pada sapi dara [41]. Oleh karena itu, selama deteksi panas dilakukan dengan benar dan ET dilakukan pada waktunya, diharapkan diperoleh hasil yang serupa mengenai angka kehamilan. Namun, perbedaan ukuran sampel antar kelompok tidak dapat diabaikan karena dapat mengganggu kekuatan statistik model. Adapun penggunaan flunixin meglumine, telah dilaporkan bahwa pemberiannya pada saat ET meningkatkan angka kebuntingan pada sapi [42]. Demikian pula, Purcell dkk. melaporkan efek menguntungkan dari pengobatan ini terhadap tingkat kehamilan, namun hal ini tergantung pada efek lokasinya [43]. Selain itu, telah diamati bahwa pemberian flunixin meglumine pada sapi dengan endometritis subklinis memiliki efek positif pada tingkat kebuntingan [44]. Mengingat perbedaan hasil, diperlukan penelitian tambahan dengan jumlah hewan yang lebih banyak.

5. Kesimpulan

Kesimpulannya, RP dan US berguna untuk melakukan seleksi penerima ET melalui evaluasi fungsi luteal. Selain itu, RP akan memungkinkan kita untuk membedakan antara struktur luteal yang berbeda (HB3 dan CL3) yang ada sekitar masa ET dan tidak dapat dibedakan dengan penentuan US atau P4. Selain itu, pada penerima yang dipilih menggunakan RP, pengukuran luas luteal, diameter, dan penentuan P4 tampaknya tidak memberikan data tambahan yang dapat menyempurnakan pemilihan hewan dengan peluang lebih tinggi untuk mempertahankan kebuntingan. Terakhir, tidak ada %CLOV maupun adanya luteal

rongga tampaknya menjadi indikator yang baik untuk tingkat kehamilan dalam prosedur ET. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk meningkatkan pemilihan penerima dan penelitian tambahan mengenai pendekatan inovatif seperti ultrasonografi Doppler dan gambaran rahim harus dilakukan.

Bahan Tambahan: Informasi pendukung berikut dapat diunduh di:https: //www.mdpi.com/article/10.3390/ani13182865/s1, Tabel S1: Manajemen embrio, menurut agen krioprotektan, untuk melakukan transfer embrio pada sapi dara Holstein..

Kontribusi Penulis: Konseptualisasi, UY dan LAQ; metodologi, UY, MB, IF dan LAQ; validasi, UY, MB, IF, PGH, JJB, AIP dan LAQ; analisis formal, UY dan LAQ; investigasi, UY, MB, IF, PGH, JJB, AIP dan LAQ; sumber daya, UY, MB, IF, PGH dan LAQ; kurasi data, UY dan LAQ; penulisan—penyusunan draf asli, UY; penulisan—review dan editing, UY, PGH, JJB, AIP dan LAQ; visualisasi, UY, JJB dan LAQ; pengawasan, MB, JIKA,
PGH, JJB, AIP dan LAQ; administrasi proyek, LAQ; perolehan pendanaan, LAQ Semua penulis telah membaca dan menyetujui versi naskah yang diterbitkan.

Pendanaan: UxSayaayAñez didanai oleh Xunta de Galicia (Referensi Kontrak Predoctoral 2020/122).

Pernyataan Dewan Peninjau Kelembagaan: Penelitian ini dilakukan sesuai dengan Peraturan Eropa dan Spanyol untuk perlindungan hewan yang digunakan untuk tujuan ilmiah (Directive 2010/63/EU, RD 53/2013). Penelitian pada hewan telah ditinjau dan disetujui oleh Komite Etika Universitas Santiago de Compostela.

Pernyataan Persetujuan yang Diinformasikan: Tak dapat diterapkan.

Pernyataan Ketersediaan Data: Data yang dihasilkan dan/atau dianalisis selama penelitian ini tersedia dari penulis terkait berdasarkan permintaan yang masuk akal.

Ucapan Terima Kasih: Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada para petani di peternakan Galicia tempat transfer embrio dilakukan atas fasilitas, hewan, dan bantuan yang diberikan untuk pengembangan penelitian.

Konflik kepentingan: Para penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan. Para pemberi dana dan perusahaan X yaituETE Cina tidak mempunyai peran dalam desain penelitian; dalam pengumpulan, analisis, atau interpretasi data; dalam penulisan naskah; atau dalam keputusan untuk mempublikasikan hasilnya.

Referensi

1. Alberio, RH Manejo de Donantes y Receptoras. Di dalam*BioteknologiSayaa de la ReproducciHaiN*; Palma, GA, Ed.; Instituto Nacional de Tecnolog SayaAgropecuaria: Buenos Aires, Argentina, 2001; hlm.21–26.
2. Hasler, JF Empat Puluh Tahun Transfer Embrio pada Sapi: Tinjauan yang Berfokus pada Jurnal Theriogenology, Pertumbuhan Industri di Amerika Utara, dan Kenangan Pribadi.*Teriogenologi***2014**,*81*, 152–169. [Referensi Silang]
3. Roper, DA; Schrick, FN; Edwards, JL; Hopkins, FM; Prado, TM; Wilkerson, JB; Saxon, AM; Muda, CD; Smith, WB Faktor pada Sapi yang Mempengaruhi Kehamilan Transfer Embrio pada Hewan Penerima.*animasi. mereproduksi. Sains.***2018**,*199*, 79–83. [Referensi Silang]
4. Hansen, PJ Janji Transfer Embrio pada Sapi yang Belum Terpenuhi—Mengapa Tingkat Kehamilan Tidak Lebih Tinggi dan Apa yang Dapat Kita Lakukan untuk Mengatasinya?*J.Anim. Sains.***2020**,*98*, skaa288. [Referensi Silang] [PubMed]
5. Pugliesi, G.; Dalmaso de Melo, G.; Silva, JB; Carvalhêkerjakan seperti; Lopes, E.; de Siqueira Filho, E.; Silva, LA; Binelli, M. Penggunaan Ultrasonografi Doppler Warna untuk Seleksi Penerima dalam Program Transfer Embrio Berwaktu pada Sapi Potong.*Teriogenologi* **2019**,*135*, 73–79. [Referensi Silang] [PubMed]
6. Stroud, B.; Hasler, JF Membedah Mengapa Superovulasi dan Transfer Embrio Biasanya Berhasil di Beberapa Peternakan tetapi Tidak di Peternakan Lainnya. *Teriogenologi***2006**,*65*, 65–76. [Referensi Silang] [PubMed]
7. Vasconcelos, JLM; Demyaitutrio, DGB; Santos, RM; Chiari, JR; Rodrigues, California; Filho, Faktor OGS yang Berpotensi Mempengaruhi Kesuburan Penerima Sapi Perah Menyusui.*Teriogenologi***2006**,*65*, 192–200. [Referensi Silang]
8. Siqueira, LGB; Torres, CAA; Souza, ED; Monteiro, PLN; Arashiro, EKN; Camargo, LSA; Fernandes, CAC; Viana, JHM Tingkat Kehamilan dan Faktor Terkait Corpus Luteum yang Mempengaruhi Pembentukan Kehamilan pada Penerima Sapi yang Disinkronkan untuk Transfer Embrio Waktu Tetap.*Teriogenologi***2009**,*72*, 949–958. [Referensi Silang]
9. Mann, G.; Lamming, G. Hubungan Lingkungan Endokrin Ibu, Perkembangan Embrio Dini dan Penghambatan Mekanisme Luteolitik pada Sapi.*Reproduksi***2001**,*121*, 175–180. [Referensi Silang]
10. Jam Tangan, D.; Taylor, V.; Cheng, Z.; Mann, G. Pertumbuhan Folikel, Fungsi Corpus Luteum dan Pengaruhnya Terhadap Perkembangan Embrio Sapi Perah Pascapersalinan.*Reproduksi***2003**,*61*, 219–237. [Referensi Silang] [PubMed]
11. Jaśkowski, BM; Herudzińska, M.; Gehrke, M.; Niżański, W. Dampak Cavitary Corpus Luteum terhadap Konsentrasi Progesteron Darah dan Tingkat Kebuntingan Induk Penerima Embrio. *Teriogenologi***2022**,*179*, 15–18. [Referensi Silang]

12. Katakanlah, E.; Ozmen, MF; Sağirkaya, H. Pengaruh Ukuran Corpus Luteum Terhadap Konsepsi Sapi Penerima Transfer Embrio. *hidup. Pejantan.* **2021**,*61*, 77–81. [Referensi Silang]
13. Yoshida, T.; Seki, M.; Watanabe, N.; Furuta, H.; Yoshimura, saya.; Osada, M.; Chiba, K.; Okada, K.; Kawasumi, K.; Ushijima, H. Hubungan Performa Reproduksi dan Palpasi Rektum dengan Fungsi Luteum Sapi Sapi 7-Beberapa hari setelah Estrus.*animasi. Sains. J.* **2012**,*83*, 207–212. [Referensi Silang]
14. Siqueira, LGB; Torres, CAA; Amorim, LS; Souza, ED; Camargo, LSA; Fernandes, CAC; Viana, JHM Keterkaitan Morfologi, Ekotekstur, dan Fungsi Corpus Luteum Sapi pada Siklus Estrus.*animasi. mereproduksi. Sains.***2009**, *115*, 18–28. [Referensi Silang]
15. Utt, MD; Johnson, GL; Beal, WE Evaluasi Aliran Darah Corpus Luteum Menggunakan USG Doppler Aliran Warna untuk Diagnosis Dini Kehamilan pada Penerima Embrio Sapi.*Teriogenologi***2009**,*71*, 707–715. [Referensi Silang] [PubMed]
16.kamuAñez, kamu.; Murillo, AV; Becerra, JJ; HerradHain, PG; Pena, AI; Quintela, LA Perbandingan Palpasi Transrektal, B-Mode dan Ultrasonografi Doppler untuk Menilai Fungsi Luteal pada Sapi Holstein.*Depan. Dokter hewan. Sains.***2023**,*10*, 1162589.[Referensi Silang]
17. Daly, J.; Smith, H.; McGrice, HA; Baik hati, KL; van Wettere, WHEJ Menuju Peningkatan Hasil Teknologi Reproduksi Berbantuan Sapi dan Domba, dengan Fokus Khusus pada Manajemen Penerima.*Hewan***2020**,*10*, 293.[Referensi Silang] [PubMed]
18. Jaśkowski, BM; Bostedt, H.; Gehrke, M.; Jaśkowski, JM Karakteristik USG Cavitary Corpus Luteum Setelah Sinkronisasi Oestrus pada Sapi Sapi dalam Kaitannya dengan Hasil Transfer Embrio.*Hewan***2021**,*11*, 1706.[Referensi Silang] [PubMed]
19. Wenzinger, B.; Bleul, U. Pengaruh Analog Prostaglandin F2α pada Cyclic Corpus Luteum selama Periode Refraktori pada Sapi.*Dokter Hewan BMC. Res.***2012**,*8*, 220.[Referensi Silang]
20. Stevenson, JS; Katrol, SL; Mellieon, HI Prostaglandin F2α dan Pemberian Hormon Pelepas Gonadotropin Meningkatkan Status Progesteron, Jumlah Luteal, dan Proporsi Sapi Perah Ovular dan Anovular dengan Corpora Lutea sebelum Program Inseminasi Buatan Berwaktu.*J. Ilmu Susu.***2012**,*95*, 1831–1844. [Referensi Silang]
21. Szelyaitutidak, Z.; Gyori, D.; tebalAr, S.; KovAcs, L.; RyaituPAya, A.; MolAr, aku.; Szenci, O. Kehamilan dan Kerugian Lahir Mati pada Sapi Perah dengan Kehamilan Tunggal dan Kembar.*Akta Dokter Hewan. Digantung.***2019**,*67*, 115–126. [Referensi Silang]
22.Bo, GA; Mapletoft, RJ Evaluasi dan Klasifikasi Embrio Sapi.*animasi. mereproduksi.***2013**,*10*, 344–348.
23. Zemjanis, R.*Teknik Diagnostik dan Terapi Reproduksi Hewan*; Perusahaan Williams dan Wilkins: Baltimore, MA, AS, 1970.
24. Hanzen, CH; Pieterse, M.; Pemandangan, O.; Drost, M. Akurasi Relatif Identifikasi Struktur Ovarium pada Sapi dengan Ultrasonografi dan Palpasi Per Rektum.*Dokter hewan. J.***2000**,*159*, 161–170. [Referensi Silang]
25. Rocha, CC; Martins, T.; Cardoso, BO; Silva, LA; Binelli, M.; Pugliesi, G. Titik Akhir Ukuran Luteal yang Diakses Ultrasonografi Yang Paling Berhubungan Dekat dengan Sirkulasi Progesteron selama Siklus Estrus dan Kehamilan Awal pada Sapi Potong.*animasi. mereproduksi. Sains.* **2019**,*201*, 12–21. [Referensi Silang]
26.Acosta, TJ; Yoshizawa, N.; Ohtani, M.; Miyamoto, A. Perubahan Lokal Aliran Darah Pada Corpus Luteum Awal dan Pertengahan Siklus setelah Suntikan Prostaglandin F 2 pada Sapi 1.*biologi. mereproduksi.***2002**,*66*, 651–658. [Referensi Silang]
27. Lüttgenau, J.; Bollwein, H. Evaluasi Aliran Darah Luteal Sapi dengan Menggunakan Ultrasonografi Color Doppler.*mereproduksi. biologi.***2014**, *14*, 103–109. [Referensi Silang] [PubMed]
28. Ginther, OJ*Pencitraan Ultrasonik dan Reproduksi Hewan*; Equiservices Pub: Cross Plains, WI, AS, 1995; ISBN 0964007282.
29.kamuAñez, kamu.; Becerra, JJ; HerradHain, PG; Pena, AI; Quintela, LA EcografSayaDoppler dan Aplikasi SuHain Dalam ReproduksiHain Bovina: RevisiHaiN.*Inf. Tec. ekonomi. Agrar.***2021**,*118*, 82–100. [Referensi Silang]
30. Siqueira, LGB; Area, VS; Getti, SAYA; Fonseca, JF; Palhao, anggota parlemen; Fernandes, CAC; Viana, JHM Color Doppler Flow Imaging untuk Deteksi Dini Sapi Tidak Hamil 20 Hari Setelah Waktu Inseminasi Buatan.*J. Ilmu Susu.***2013**,*96*, 6461–6472. [Referensi Silang]
31. Dubuc, J.; Houle, J.; Rousseau, M.; Roy, JP; Buczinski, S. Komunikasi Singkat: Akurasi Ultrasonografi Doppler Aliran Warna Corpus Luteum untuk Mendiagnosis Ketidakhamilan pada Sapi Perah pada Hari ke 21 setelah Inseminasi.*J. Ilmu Susu.***2020**,*103*, 2019–2023. [Referensi Silang] [PubMed]
32. Siqueira, LG; Arashiro, EK; Getti, SAYA; Souza, ED; Feres, LF; Pfeifer, LF; Fonseca, JF; Viana, JH Gambaran Vaskular dan Morfologi Corpus Luteum 12 hingga 20 Hari setelah Inseminasi Buatan pada Sapi Perah.*J. Ilmu Susu.***2019**,*102*, 5612–5622. [Referensi Silang]
33. Herzog, K.; Brockhan-Lüdemann, M.; Kaske, M.; Beindorff, N.; Paulus, V.; Niemann, H.; Bollwein, H. Aliran Darah Luteal Merupakan Indikator yang Lebih Tepat untuk Fungsi Luteal selama Siklus Estrus Sapi daripada Ukuran Luteal.*Teriogenologi***2010**,*73*, 691–697. [Referensi Silang]
34. Pugliesi, G.; de Melo, GD; diSayade, GA; Pellegrino, CAG; Silva, JB; Rocha, CC; Motta, IG; Vasconcelos, JLM; Binelli, M. Penggunaan Ultrasonografi Doppler dalam Program Transfer Embrio: Kelayakan dan Hasil Lapangan.*animasi. mereproduksi.***2018**,*15*, 239–246. [Referensi Silang]
35. Ferraz, PA; Burnley, C.; Karanja, J.; Viera-Neto, A.; Santos, JEP; Chebel, RC; GalvAo, KN Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Program Transfer Embrio Besar-besaran pada Sapi Holstein dalam Kawanan Komersial di Wilayah Tenggara Amerika Serikat. *Teriogenologi***2016**,*86*, 1834–1841. [Referensi Silang]
36. Herzog, K.; Kiossis, E.; Bollwein, H. Pemeriksaan Perubahan Siklik pada Echotexture Bovine Luteal Menggunakan Teknik Pengenalan Pola Statistik Berbantuan Komputer.*animasi. mereproduksi. Sains.***2008**,*106*, 289–297. [Referensi Silang]

37. Scully, S.; Evans, ACO; Carter, F.; Duffy, P.; Penyendiri, P.; Crowe, MA Pemantauan Ultrasonografi Aliran Darah dan Gema Tekstur Korpus Luteum dan Rahim Selama Kehamilan Dini Sapi Sapi dara. *Teriogenologi* **2015**, *83*, 449–458. [Referensi Silang] [PubMed]
38. Saudara, MC; Saudara, C.; Cordeiro, MB; SAFilho, MFd; Mesquita, FS; Nogueira, PDB; Binelli, M.; Membrive, Manifestasi CMB dari Perilaku Estrus dan Konsentrasi Progesteron Selanjutnya pada Transfer Embrio Berwaktu pada Sapi Berhubungan Positif dengan Keberhasilan Kehamilan Penerima. *animasi. mereproduksi. Sains.* **2014**, *151*, 85–90. [Referensi Silang] [PubMed]
39. SAFilho, MF; Santos, JEP; Ferreira, RM; Penjualan, JNS; Baruselli, PS Pentingnya Estrus pada Kebuntingan per Inseminasi pada Sapi Bos Indicus yang Disusui Tunduk pada Protokol Inseminasi Berwaktu Berbasis Estradiol/Progesteron. *Teriogenologi* **2011**, *76*, 455–463. [Referensi Silang]
40. Perez-Marin, C. Pembentukan Corpora Lutea dan Rongga Luteal Tengah serta Hubungannya dengan Kadar Progesteron Plasma dan Parameter Metabolik Lainnya pada Sapi Perah. *mereproduksi. Domestik. animasi.* **2009**, *44*, 384–389. [Referensi Silang]
41. Martinez, MF; Adams, dokter umum; Kastelik, JP; Bergfelt, DR; Mapletoft, RJ Induksi Kemunculan Gelombang Folikuler untuk Sinkronisasi Estrus dan Inseminasi Buatan pada Sapi Sapi dara. *Teriogenologi* **2000**, *54*, 757–769. [Referensi Silang] [PubMed]
42. Adegan, FN; Hockett, SAYA; Kota, TM; Saxon, AM; Rohrbach, NR; Wehrman, AKU; Schrick, FN Pengaruh Inhibitor Sintesis Prostaglandin yang Diberikan pada Transfer Embrio Terhadap Tingkat Kebuntingan Sapi Penerima. *Prostaglandin Mediat Lipid Lainnya.* **2005**, *78*, 38–45. [Referensi Silang]
43. Purcell, SH; Beal, KAMI; Gray, KR Pengaruh Sisipan CIDR dan Meglumine Flunixin yang Diberikan pada Saat Transfer Embrio terhadap Tingkat Kebuntingan dan Sinkronisasi Estrus pada Sapi Potong. *Teriogenologi* **2005**, *64*, 867–878. [Referensi Silang]
44. Barnes, M.; Kasimanickam, R.; Kasimanickam, V. Pengaruh Pemberian Endometritis Subklinis dan Flunixin Meglumine terhadap Kehamilan pada Sapi Potong Penerima Embrio. *Teriogenologi* **2023**, *201*, 76–82. [Referensi Silang] [PubMed]

Penafian/Catatan Penerbit: Pernyataan, pendapat dan data yang terkandung dalam semua publikasi adalah sepenuhnya milik masing-masing penulis dan kontributor dan bukan milik MDPI dan/atau editor. MDPI dan/atau editor melepaskan tanggung jawab atas kerugian apa pun pada orang atau properti akibat ide, metode, instruksi, atau produk apa pun yang dirujuk dalam konten.

Daftar isi tersedia diSains Langsung

Satwa

Jurnal internasional biosains hewan

Tinjauan: Status penilaian korpus luteum terkini dengan ultrasonografi Doppler untuk mendiagnosis kondisi tidak hamil dan memilih penerima embrio pada sapi

Guilherme Pugliesi[A,⇑], Amanda Guimaraes da Silva[A], Joao Henrique Moreira Viana[B], Luiz Gustavo Bruno Siqueira[C]

[A]Departemen Reproduksi Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan dan Ilmu Hewan, Universitas São Paulo, Pirassununga, SP 13635-900, Brazil
[B]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF 70770-190, Brasil
[C]Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG 36038-330, Brasil

info artikel

Sejarah artikel:
Diterima 5 Oktober 2022
Revisi 13 Februari 2023
Diterima 20 Februari 2023

Kata kunci:
Embrio
Teknologi pencitraan
Fungsi luteal
Kehamilan
Progesteron

abstrak

Sejumlah potensi penggunaan ultrasonografi Doppler telah dieksplorasi dalam beberapa dekade terakhir, baik sebagai alat penelitian dalam penyelidikan fisiologi reproduksi maupun untuk manajemen reproduksi hewan ternak. Tujuan dari tinjauan ini adalah untuk membahas beberapa strategi terkini yang dikembangkan dalam program reproduksi fixed-time dan sinkronisasi ulang ovulasi pada sapi, berdasarkan evaluasi fungsi korpus luteum dengan pencitraan USG Doppler warna. Penelitian terbaru pada sapi perah dan sapi potong menunjukkan akurasi yang tinggi ketika ultrasonografi Doppler digunakan untuk menilai fungsi korpus luteum dan mengidentifikasi betina yang tidak hamil pada 20-24 hari setelah berkembang biak. Oleh karena itu, program sinkronisasi ulang super dini yang dimulai pada minggu kedua setelah inseminasi buatan atau transfer embrio telah dikembangkan dan diterapkan dalam program reproduksi berbantuan komersial; dengan demikian, mengantisipasi pembuahan dengan air mani yang terbukti atau embrio yang secara genetik lebih unggul. Selain itu, penilaian perfusi darah korpus luteum dapat digunakan untuk mengidentifikasi penerima embrio dengan kesuburan tinggi dalam program transfer embrio waktu tetap.

- 2023 Para Penulis. Diterbitkan oleh Elsevier BV atas nama The Animal Consortium. Ini adalah akses terbuka artikel di bawah lisensi CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Implikasi

Alternatif saat ini untuk mengevaluasi fungsi korpus luteum dengan pencitraan ultrasonografi Doppler berwarna menunjukkan adanya alat baru yang dapat meningkatkan kinerja reproduksi dan profitabilitas operasi sapi perah dan daging. Metode yang ditentukan untuk menentukan perfusi darah luteal memungkinkan estimasi fungsi luteal pada berbagai fase siklus estrus dan awal kehamilan serta hubungannya dengan profil progesteron yang bersirkulasi. Tinjauan ini memberikan gambaran konsep teknis dan fisiologis yang mendasari penggunaan ultrasonografi Doppler untuk penilaian perfusi darah korpus luteum dan menyoroti penerapannya dalam manajemen reproduksi untuk membangun kegunaan terapan pada sapi.

Perkenalan

Prinsip dasar USG Doppler adalah efek Doppler, yaitu pergeseran frekuensi gelombang suara yang dipantulkan oleh suatu benda bergerak menuju atau menjauhi probe. Dalam USG medis, pergeseran ini diamati pada gema sel darah dan, dengan demikian, digunakan untuk menggambarkan aliran darah dalam jaringan atau organ (Ginther, 2007). Ultrasonografi Doppler memberikan informasi penting tentang status fungsional suatu jaringan atau organ, yang menyebabkan penerapannya di banyak bidang kedokteran manusia dan hewan. Dalam reproduksi sapi, USG Doppler telah digunakan selama lebih dari dua dekade untuk mempelajari perfusi pembuluh darah di ovarium, rahim dan vagina, serta janin dan plasenta (diulas olehHerzog & Bollwein, 2007; Matsui & Miyamoto, 2009; Bollwein dkk., 2016).

Terlepas dari peningkatan kualitas dan akurasi diagnostik yang tidak dapat disangkal, perangkat yang dilengkapi dengan mode Doppler dan lisensi terkait biasanya jauh lebih mahal dibandingkan perangkat konvensional yang hanya menggunakan mode B. Perbedaan harga ini menghambat adopsi teknologi yang lebih luas oleh para praktisi lapangan di masa lalu. Titik baliknya adalah demonstrasi bahwa USG Doppler dapat digunakan sebagai alat praktis untuk manajemen reproduksi ternak, khususnya untuk diagnosis dini tidak hamil berdasarkan korpus luteum (CL)perfusi darah (CLBP) (Siqueira dkk., 2013; Pugliesi dkk., 2014). Deteksi dini pada sapi yang tidak bunting sangat penting untuk pengembangan strategi

⇑Penulis yang sesuai.
Alamat email:gpugliesi@usp.br (G.Pugliesi).

https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100752
1751-7311/- 2023 Para Penulis. Diterbitkan oleh Elsevier BV atas nama The Animal Consortium. Ini adalah artikel akses terbuka di bawah lisensi CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

untuk mengurangi jumlah hari terbuka dan interval beranak, sehingga meningkatkan kinerja reproduksi ternak (Gnemmi dkk., 2022). Perkembangan penerapan praktis USG Doppler dalam manajemen reproduksi pada akhirnya menyebabkan peningkatan besar dalam minat terhadap teknologi ini, seperti yang terlihat dari jumlah makalah ilmiah yang diterbitkan mengenai subjek ini selama 10 tahun terakhir dengan menyilangkan kata kunci terkait dalam database seperti PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/).

Tujuan dari tinjauan ini adalah untuk menyajikan konsep teknis dan fisiologis yang mendasari penggunaan ultrasonografi Doppler warna untuk penilaian CLBP, dan penerapan selanjutnya dalam pengelolaan reproduksi ternak sapi perah dan daging.

Penilaian Corpus luteum dengan ultrasonografi Doppler

Sinyal Doppler dapat ditampilkan pada layar perangkat USG sebagai grafik spektral atau gambar aliran warna. Mode spektral menampilkan sinyal Doppler sebagai grafik kecepatan waktu, yang menggambarkan perubahan aliran darah yang terkait dengan siklus jantung (Ginther, 2007). Kecepatan darah dan indeks pulsatilitas dan resistensi dapat diperoleh dari grafik spektral. Namun, pengukuran tersebut dihitung untuk masing-masing arteri dan, dengan demikian, lebih berguna jika satu pembuluh darah besar, menyumbang sebagian besar suplai darah ke jaringan atau organ (misalnya, arteri uterina;Herzog & Bollwein, 2007). Selain itu, imobilitas diperlukan untuk mendapatkan grafik spektral yang baik, terutama untuk kapal kecil, sehingga pemeriksaan ini memakan waktu lama dan seringkali tidak dapat dilakukan pada hewan besar. Oleh karena itu, sebagian besar penelitian tentang CLBP pada sapi dilakukan berdasarkan analisis area warna yang ditampilkan pada gambar aliran warna Doppler.

Mode aliran warna menghasilkan gambar perfusi darah secara real-time dan mudah diinterpretasikan, yang menggambarkan vaskularisasi CL. Namun, penggunaan data Doppler warna untuk penelitian atau sebagai alat diagnostik biasanya memerlukan analisis komparatif dengan mempertimbangkan perubahan dari waktu ke waktu, atau perbedaan individu di antara hewan, atau bahkan relatif terhadap nilai batas. Oleh karena itu, setelah dilakukan penilaian visual, CLBP masih perlu diukur. Dalam hal ini, kita harus mempertimbangkan bahwa CL dikelilingi oleh pleksus kompleks kapiler yang berliku-liku dan pembuluh darah kecil (Macchiarelli dkk., 1998), menjadikan perkiraan vaskularisasi yang tepat sebagai tantangan besar. Pendekatan yang berbeda telah diusulkan untuk mengevaluasi CLBP, dengan mempertimbangkan tidak hanya akurasi tetapi juga besarnya perbedaan yang diharapkan, kemungkinan pengambilan keputusan secara real-time, dan kelayakan dalam kondisi lapangan.

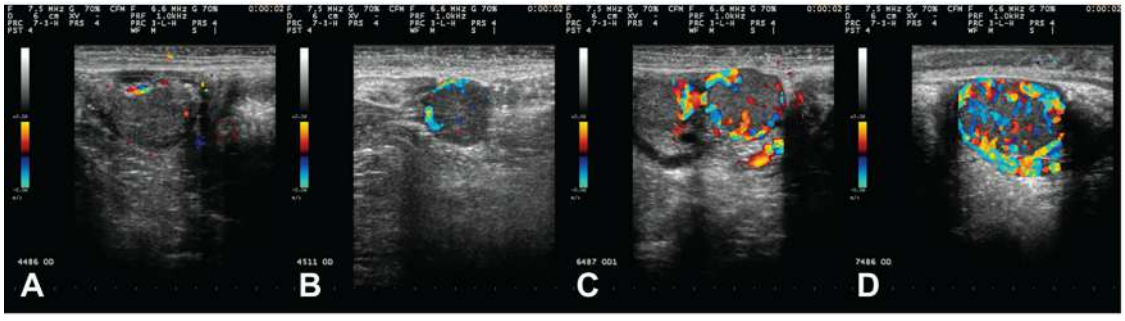
Cara paling mudah untuk mengkarakterisasi CLBP adalah penilaian subjektif oleh evaluator terhadap jumlah area berwarna dalam gambar Doppler (Siqueira dkk., 2013; Guimarães dkk., 2015) (Gambar 1). Pendekatan ini memiliki keuntungan dalam memperhitungkan keseluruhan pemindaian jaringan, karena skor diberikan berdasarkan rekonstruksi mental 3D pada organ. Apalagi memungkinkan diagnosis waktu nyata dan pengambilan keputusan cepat, yang sering kali diperlukan untuk penggunaan praktis teknologi. Seperti halnya sistem penilaian subjektif lainnya, sistem ini bergantung pada pengalaman penilai dan konsistensinya cenderung meningkat seiring berjalannya waktu. Tingkat kesepakatan antara evaluator dengan pengetahuan serupa mengenai teknologi sangat tinggi, dan korelasinya dengan evaluasi obyektif juga tinggi (Siqueira dkk., 2013).

Meskipun teknisi dapat melihat perbedaan kecil dalam perfusi darah, sistem penilaian membatasi kemampuan kita untuk membedakannya. Dalam hal ini, keakuratan diagnosis bergantung pada perbedaan yang diharapkan antar kategori. Misalnya saja, CLBP secara drastis mengubah kondisi antara sapi bunting dan sapi tidak bunting sejak hari ke 16 setelah AI dan seterusnya (Siqueira dkk., 2019), dan skor subjektif dapat digunakan secara efektif untuk memprediksi status tidak hamil (Siqueira dkk., 2013; Pugliesi dkk., 2014). Di sisi lain, studi asosiasi seperti untuk menentukan hubungan antara CLBP dan progesteron (P4)produksi mungkin memerlukan diskriminasi terhadap perubahan kecil pada CLBP (Herzog dkk., 2010; Pugliesi dkk., 2019b).

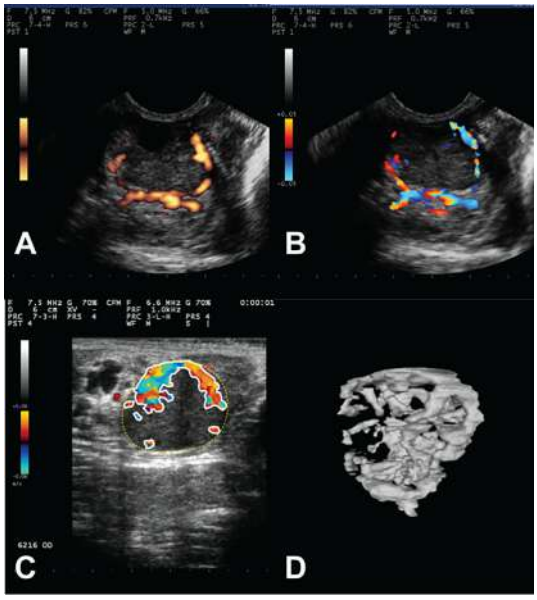
Area berwarna atau jumlah piksel berwarna (nilai RGB – 0) dalam suatu gambar dapat diukur secara objektif menggunakan kaliper internal perangkat ultrasonik atau dibantu oleh perangkat lunak analisis gambar (Herzog dkk., 2010; Siqueira dkk., 2019) (Gambar 2). Hasilnya disajikan sebagai variabel kontinu, dinyatakan sebagai absolut (misalnya mm^2) atau nilai relatif (% jaringan). Penggunaan indeks relatif menarik karena memperhitungkan volume total jaringan yang didukung oleh sejumlah suplai darah dan dengan demikian memberikan gambaran yang lebih baik mengenai status fisiologisnya. Nyatanya,Siqueira dkk. (2019)memperoleh area bawah kurva yang sedikit lebih tinggi untuk CLBP yang disesuaikan dengan ukuran CL dibandingkan untuk CLBP saja (masing-masing 0,81 vs 0,78) dalam analisis Kurva Operator Penerima yang digunakan untuk menentukan hubungan antara setiap titik akhir CL dan status kehamilan.

Gambar yang dihasilkan dengan aliran warna atau power Doppler dapat digunakan untuk mengukur perfusi darah. Namun, bergantung pada pengaturan perangkat, sinyal berwarna pada gambar yang dihasilkan dengan power Doppler mungkin memiliki tepi yang buram, dibandingkan dengan sinyal berwarna dari Doppler berwarna (Gambar 2A dan B), sehingga menyulitkan untuk membatasi area dengan warna tertentu. Di sisi lain, informasi intensitas aliran yang disediakan oleh power Doppler akan lebih berguna daripada arah aliran, yang biasanya dinilai dengan Doppler warna. Namun demikian, perbedaan rata-rata warna piksel lebih kompleks untuk dianalisis dan saat ini tidak diperhitungkan dalam sebagian besar penelitian.

Untuk tujuan penelitian, penghitungan area perfusi darah dapat mengatasi keterbatasan intrinsik terkait subjektivitas skor dan kurangnya kekuatan statistik terkait dengan analisis variabel diskrit. Namun pendekatan ini memerlukan pemilihan bingkai gambar yang representatif, yang pada akhirnya juga menciptakan tingkat subjektivitas tertentu. Seringkali, gambar yang dipilih ini adalah



Gambar 1.(A – D) Gambar Doppler berwarna dari bovine corpora lutea menunjukkan derajat CLBP yang berbeda (meningkat dari A ke D). Panel A juga mewakili wanita tidak hamil yang didiagnosis berdasarkan CLBP untuk mendeteksi luteolisis (CL dengan perfusi darah -25% dan tanpa sinyal warna di tengah jaringan luteal). Panel B, C dan D juga masing-masing menunjukkan CLBP rendah, sedang dan tinggi. Singkatan: CLBP = perfusi darah korpus luteum; CL = korpus luteum.



Gambar 2.(A – D) Pendekatan berbeda untuk mengevaluasi gambar Doppler dari bovine corpora lutea. (A, B) evaluasi subyektif gambar yang dihasilkan dengan Doppler kekuatan- (A) atau aliran warna (B); (C) kuantifikasi objektif area berwarna dalam CL yang dinilai dengan pencitraan aliran warna. Piksel berwarna dibatasi oleh garis putih dan seluruh area CL dengan garis putus-putus kuning; (D) Rekonstruksi tiga dimensi CLBP. Singkatan: CLBP = perfusi darah korpus luteum; CL = korpus luteum.

didefinisikan secara sewenang-wenang sebagai kerangka penampang area pusat CL pada diameter maksimumnya atau kerangka dengan jumlah sinyal Doppler yang lebih besar (Viana dkk., 2013). Namun demikian, karena distribusi vaskularisasi yang tidak merata di sekitar folikel dan CL, perbedaan kecil sekalipun pada posisi atau sudut pemeriksaan dapat menyebabkan bias dalam pengukuran, seperti yang diamati pada folikel ovarium (Arashiro dkk., 2013).

Pengukuran objektif sinyal Doppler warna biasanya memerlukan pemrosesan dan analisis gambar pascaakuisisi. Untungnya, tren pencitraan biomedis saat ini adalah bahwa alat analisis gambar berbantuan komputer akan semakin tersedia sebagai teknologi yang tertanam dalam perangkat ultrasound, sehingga memungkinkan diagnosis secara real-time. Secara umum, analisis gambar tunggal tidak memerlukan kapasitas pemrosesan komputer yang besar dan banyak perangkat lunak untuk analisis gambar, termasuk beberapa perangkat lunak bebas lisensi atau sumber terbuka, tersedia secara luas.

Volumetri saat ini digunakan dalam pencitraan penyakit dalam untuk mengukur struktur yang bentuknya tidak beraturan dan dapat menjadi alternatif untuk menilai CLBP. Vaskularisasi CL biasanya bercabang dan berliku-liku, dan berbentuk tiga atau empat dimensi (3D/4D)rekonstruksi kemungkinan akan memberikan representasi terbaik dari arsitektur vaskular jaringan (Viana dkk., 2013). Faktanya, pendekatan ini memperhitungkan beberapa bingkai yang mewakili keseluruhan organ, sekaligus memberikan pengukuran obyektif dari sinyal Doppler (Scully dkk., 2014). Keterbatasan penggunaan volumetri untuk evaluasi CLBP sebagian besar bersifat teknologi. Alat pengukuran 3D/4D bawaan USG memerlukan kapasitas pemrosesan data yang besar. Selain itu, analisis gambar pascapemrosesan menggunakan rekaman klip video merupakan perangkat lunak rekonstruksi 3D yang padat karya dan sesuai permintaan (Viana dkk., 2013; Scully dkk., 2014). Sebagian besar perangkat USG 3D/4D yang tersedia saat ini terlalu mahal dan tidak cocok untuk digunakan di lapangan atau tidak memiliki kapasitas pemrosesan untuk menghindari penundaan gambar dan distorsi terkait akibat pergerakan organ selama pemindaian. Namun demikian, kemajuan teknologi dapat mengubah volumetri menjadi alat penting untuk mempelajari hemodinamik CL di masa depan.

Perfusi darah luteal selama siklus estrus dan awal kehamilan

CL adalah kelenjar endokrin sementara yang terutama mensekresi P4, yang penting untuk pembentukan kebuntingan pada ruminansia dan hewan ternak lainnya (Mann dan Lamming, 1995). Perkembangan CL setelah ovulasi sering dibagi menjadi tiga fase utama: fase luteal awal atau luteogenesis; fase pertengahan luteal atau statis; regresi atau luteolisis (Niswender dkk., 2000). Pengenalan kehamilan oleh ibu dikaitkan dengan pemeliharaan CL yang berfungsi penuh, mensekresi P4 dalam jumlah yang cukup untuk mendukung perkembangan embrio awal (Penyendiri, 2011).

Karena sifatnya yang sementara, CL harus berkembang secara fisik dan berfungsi dengan sangat cepat agar kehamilan dapat terjadi atau, jika terjadi kegagalan konsepsi, siklus estrus baru dimulai. Ciri-ciri khusus CL ini terutama diatur oleh angiogenesis yang intens (Acosta dan Miyamoto, 2004) untuk pengembangan sel luteal yang tepat selama luteogenesis (fase luteal awal), dan pengiriman nutrisi dan prekursor steroid untuk mendukung sekresi P4 ke dalam aliran darah (fase pertengahan luteal). Karena sifat CL yang sangat angiogenik dan vaskular (Fraser dan Wulff, 2003), penggunaan ultrasonografi Doppler telah menjadi alat yang andal dan berguna untuk menilai fungsi CL secara tidak langsung dengan menggambarkan perfusi darah ke dalam kelenjar (Bollwein dkk., 2016).

Dalam skenario ini, pencitraan aliran Doppler berwarna telah lama berhasil digunakan untuk mengukur aliran darah ke ovarium ruminansia selama siklus estrus yang teratur (Honnens dkk., 2008; Herzog dkk., 2010). Perfusi darah di ovarium yang mengandung CL meningkat secara dramatis dari estrus ke pertengahan siklus (diestrus) pada domba betina (Niswender dkk., 1975), ternak (Herzog dkk., 2010) dan spesies lainnya (Miyazaki dkk., 1998) diikuti dengan penurunan pada akhir siklus estrus (Siqueira dkk., 2019). Selain pola teratur peningkatan-penurunan perfusi darah selama perkembangan CL dalam siklus estrus, penelitian juga menunjukkan peningkatan progresif CLBP pada wanita hamil (Herzog dkk., 2011; Siqueira dkk., 2019) mungkin sebagai konsekuensi dari adanya konseptus dan sekresi faktor luteotropik.

Jika pembuahan gagal, luteolisis terjadi dan didorong oleh luteolysin yang dibawa oleh rahim, terutama prostaglandin $F_{2\alpha}$(Niswender dkk., 2000). Beberapa penulis telah membagi luteolisis menjadi dua peristiwa utama: luteolisis fungsional (kehilangan fungsi) dan luteolisis struktural (regresi fisik jaringan luteal). Pertama, turunnya CLBP (Siqueira dkk., 2019) segera menekan produksi dan sekresi P4. Kemudian, sel luteal mengalami apoptosis, diikuti dengan nekrosis dan remodeling jaringan (Pat, 1994). Dua peristiwa besar dalam proses luteolisis ini terjadi pada titik waktu yang berbeda, misalnya, terdapat perbedaan waktu antara hilangnya fungsi (pengurangan P4 dalam sirkulasi) dan regresi fisik CL (pengurangan ukuran) (Siqueira dkk., 2009a; 2019). Oleh karena itu, CLBP sangat berkorelasi dengan konsentrasi P4 plasma, sedangkan korelasi antara area jaringan luteal dan P4 plasma tidak terlalu tinggi selama fase statis dan regresi (Herzog dkk., 2010). Demikian pula, sirkulasi P4 berkorelasi dengan aliran darah ke ovarium yang mengandung CL pada sapi (Herzog dkk., 2010).

Terdapat bukti kuat yang mendukung gagasan bahwa CLBP yang lebih tinggi berkorelasi positif dengan peningkatan peluang keberhasilan kehamilan. Dalam sebuah studi tentang fitur vaskular dan morfologi CL sapi,Siqueira dkk. (2019)melaporkan CLBP yang progresif dan lebih besar secara konsisten dari hari ke 16 hingga hari ke 20 setelah inseminasi buatan (TAI)pada wanita hamil dibandingkan dengan wanita tidak hamil. Namun, luas jaringan luteal hanya berbeda antara hamil dan tidak hamil pada hari ke 20, pada akhir siklus estrus normal. Demikian pula, karakteristik CL lainnya seperti tekstur gema P4 dan CL yang bersirkulasi bukanlah prediktor yang baik terhadap kemungkinan hamil. Peningkatan progresif dalam CLBP

(Herzog dkk., 2011) dan aliran darah rahim pada minggu-minggu pertama kehamilan (Honnens dkk., 2008) juga telah dilaporkan sebelumnya dan yang terakhir mungkin secara tidak langsung terlibat dalam peningkatan perfusi darah pada ovarium yang mengandung CL.

Hubungan antara progesteron yang bersirkulasi, area jaringan luteal, tekstur gema, dan perfusi darah

Perkembangan CL dan kapasitas untuk memproduksi dan mensekresi P4 bergantung pada jumlah sel luteal steroidogenik (kecil dan besar) dan dukungan pembuluh darah untuk menyediakan nutrisi dan prekursor untuk sekresi steroid. Oleh karena itu, tidak mengherankan jika area jaringan luteal memiliki korelasi positif yang tinggi dengan P4 plasma, terutama selama diestrus awal (Niswender dkk., 2000; Siqueira dkk., 2009a; Scully dkk., 2014). Selama fase ini, luteogenesis dan pengembangan CL bertanggung jawab atas peningkatan bertahap sekresi dan konsentrasi P4 dalam plasma. Pada pertengahan masa diestrus, ukuran CL (area luteal) mencapai nilai maksimumnya, diikuti oleh puncak sirkulasi P4 beberapa hari kemudian (Siqueira dkk., 2009a).

Angiogenesis yang luas dan distribusi sel luteal dalam CL divisualisasikan secara sonografi sebagai pola gambar hipoekoik dan perubahan dalam pola ini mungkin mencerminkan fase dan fungsi luteal yang berbeda (Tom dkk., 1998). Dalam hal ini, penelitian sebelumnya telah menyelidiki korelasi antara plasma P4 dan echotexture CL kuantitatif (didefinisikan sebagai pola ekogenisitas). Namun hasilnya agak tidak konsisten (Siqueira dkk., 2009a; 2019). Secara umum, tampaknya kecerahan piksel (nilai piksel rata-rata) dalam jaringan CL memiliki nilai terbatas untuk kesimpulan tentang fungsi CL (sekresi plasma P4). Sebaliknya, variasi kecerahan piksel dalam jaringan luteal, yaitu heterogenitas piksel, tampaknya menjadi indikator yang baik untuk fungsi luteal dan memiliki korelasi yang cukup tinggi dengan P4 plasma selama luteolisis (Siqueira dkk., 2009a). Dengan kata lain, gambaran ultrasonik dari jaringan luteal yang heterogen sering diamati pada fase luteal awal (metestrus) dan setelah permulaan luteolisis, yang mencerminkan pengorganisasian yang sedang berlangsung (metestrus) atau disorganisasi (luteolisis) dari CL itu sendiri (sel luteal, jaringan ikat). , dan pembuluh darah). Namun, gambar USG dengan nilai heterogenitas piksel rendah diamati selama diestrus, bersamaan dengan skenario P4 bersirkulasi tinggi, bukti jaringan luteal homogen yang sebagian besar ditutupi oleh sel-sel pensekresi steroid luteal kecil dan besar (Niswender dkk., 2000).

Gunakan untuk deteksi dini status kehamilan

Diagnosis kehamilan berbasis USG biasanya dilakukan dengan B-mode dan hanya direkomendasikan setelah 28-30 hari kehamilan (Pieterse dkk., 1990), karena pada periode ini akurasi visualisasi konsep mencapai 100% (Bangsa dkk., 2003). Namun, deteksi regresi CL spontan dengan USG pada sapi yang tidak bunting dapat memungkinkan penilaian status kehamilan lebih awal (Pugliesi dkk., 2013; Pugliesi dkk., 2014; Scully dkk., 2014; 2015; Siqueira dkk., 2019).

Evaluasi ukuran CL telah digunakan dengan akurasi tinggi untuk mengidentifikasi sapi yang tidak bunting setelah hari ke 20 kebuntingan (Kastelic dkk., 1991), tetapi konsentrasi P4 plasma/serum memiliki korelasi yang lebih besar dengan CLBP dibandingkan ukuran CL selama periode luteolitik pada ruminansia (Herzog dkk., 2010; Balaro dkk., 2017; Rocha dkk., 2019). Hal ini menunjukkan bahwa penurunan CLBP terjadi sebelum luteolisis struktural dan telah diamati sejak hari ke 16 setelah TAI pada sapi perah dan sapi dara (Siqueira dkk., 2019). Selain itu, tingkat hasil negatif palsu yang cukup besar juga terlihat ketika hanya menggunakan area CL untuk mendeteksi luteolisis pada sapi potong yang tidak bunting, karena beberapa hewan memiliki CL yang kecil namun berfungsi untuk pemeliharaan kebuntingan (Pugliesi dkk., 2018).

Sepengetahuan kami, upaya pertama untuk mendiagnosis kehamilan dengan deteksi luteolisis menggunakan pencitraan Doppler dilaporkan oleh Utt dkk. (2009)pada sapi penerima daging sapi; namun, metode yang digunakan untuk menentukan CLBP memakan waktu dan menghasilkan akurasi yang rendah (Tabel 1). Dengan demikian, penelitian yang lebih mendalam selama luteolisis spontan menandai perubahan CLBP antara sapi bunting dan tidak bunting (Matsui dan Miyamoto, 2009; Pugliesi dkk., 2014). Hasilnya memungkinkan definisi CLBP selama luteolisis dan menjadi dasar dalam penelitian perintis di bidang produk susu (Siqueira dkk., 2013) dan daging sapi (Pugliesi dkk., 2014) untuk konsep penerapan kriteria untuk mengidentifikasi CL fungsional atau non-fungsional pada awal kehamilan. Pada sapi perah betina, akurasi tinggi dan nilai prediksi negatif (NPV) diperoleh olehSiqueira dkk. (2013)pada 20 hari pasca-TAI hanya menggunakan CLBP. Pada sapi potong diperoleh akurasi 91% dan NPV 100% untuk menentukan status kebuntingan pada hari ke 20 pasca TAI (Pugliesi dkk., 2014). Meskipun definisi yang berbeda digunakan untuk mengidentifikasi CL non-fungsional dalam penelitian ini, kriterianya serupa untuk mendeteksi wanita tidak hamil dan diagnosis dini dibandingkan dengan metode standar emas pada hari ke 30 kehamilan. Kedua metode tersebut menggunakan evaluasi subjektif dan realtime (Gambar 1) yang lebih sederhana dan praktis dibandingkan menggunakan penghitungan piksel untuk menentukan area berwarna dan mengklasifikasikan CL berfungsi atau tidak (Pugliesi dkk., 2018).

Karena metode ini tidak memungkinkan visualisasi embrio, dapat dikatakan bahwa teknik USG Doppler warna memungkinkan deteksi luteolisis untuk identifikasi/diagnosis tidak langsung dini pada wanita tidak hamil. Penelitian lain (Tabel 1) dilakukan pada ras dan kelas paritas yang berbeda dan mengkonfirmasi akurasi yang tinggi dan tingkat hasil negatif palsu yang nol atau sangat rendah dengan menggunakan usulan pemotongan pada sapi perah dan sapi potong. Secara keseluruhan, hasil-hasil ini mendukung bahwa penentuan CLBP adalah metode diagnosis yang akurat untuk mendeteksi status kehamilan, karena kecil kemungkinannya untuk salah mendeteksi wanita hamil sebagai tidak hamil, sehingga menghasilkan NPV yang tinggi bila diterapkan setelah 19 hari kehamilan.

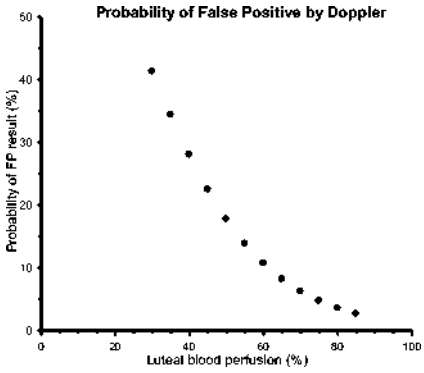
Meskipun demikian, proporsi positif palsu (FP)hasil (sapi didiagnosis bunting berdasarkan Doppler, namun sebenarnya tidak dipastikan bunting berdasarkan diagnosis standar emas) merupakan faktor utama yang membedakan antar penelitian (Tabel 1). Hasil KB dapat terjadi karena berbagai alasan yang mengakibatkan adanya CL aktif pada hari diagnosis berbasis CLBP. Ovulasi yang terlambat dalam program berjangka waktu dan variasi waktu luteolisis fisiologis di antara ras dan urutan paritas merupakan penjelasan yang mungkin, namun penyebab terbesar terjadinya KB tampaknya berkaitan dengan laju kehilangan embrio dini antara Doppler dan diagnosis konfirmasi. Baru-baru ini, penelitian berbeda di Nelore (Dalmaso de Melo dkk., 2020),Bos taurus daging sapi (Holton dkk. 2022a; 2022b) dan Holstein (Madoz dkk., 2022) wanita telah mengindikasikan dengan mengevaluasi ekspresi gen yang distimulasi interferon dalam sirkulasi sel imun dan/atau protein terkait kehamilan, bahwa setidaknya sepertiga dari hasil KB terjadi karena kehilangan embrio dini antara hari ke 19/20 dan 30–34 kehamilan. Secara kolektif, hasil ini menunjukkan bahwa sebagian besar hasil KB mungkin disebabkan oleh fase luteal yang berkepanjangan dibandingkan kematian embrio yang tidak dapat diketahui oleh ibu mengenai kehamilannya. Hal ini didukung oleh angka 10–15% sapi dara dan sapi Nelore yang disinkronkan untuk TAI, namun tidak diinseminasi, yang tidak mengalami luteolisis hingga 22 hari setelah estrus sewenang-wenang (Ataíde dkk., 2021).

Selain itu, perlu dicatat bahwa tidak ada perbedaan signifikan pada CLBP pada hari ke 20 dan 22 yang diamati antara wanita yang didiagnosis positif dan FP (Holton dkk., 2022a), namun konsentrasi CLBP dan P4 plasma pada hari ke 20 lebih rendah pada wanita dengan indikasi kematian embrio antara hari ke 20 dan 25 kehamilan (Dalmaso de Melo dkk., 2020). Kami juga melakukan analisis terkini (tidak dipublikasikan;Gambar 3) yang menunjukkan bahwa proporsi CLBP pada hari ke 20 berhubungan negatif dengan tingkat hasil KB.

Tabel 1
Studi yang membandingkan penggunaan ultrasonografi Doppler untuk mendeteksi fungsi luteal untuk diagnosis status kebuntingan antara hari ke 17 dan hari ke 22 dan ultrasonografi mode B untuk mendeteksi embrio setelah hari ke 28 kebuntingan pada sapi potong dan sapi perah serta sapi dara.

Penulis	Jenis / ras	Urutan paritas	Jenis layanan	Momen kehamilan, d	Hewan, n	Pembuahan kecepatan, %	Akurasi, %	Positif palsu, % (jumlah)	Negatif palsu, % (jumlah)	PPV, %	NPV, %
Utt dkk., 2009	Daging Sapi (Persilangan)	Sapi	TET	17	50	46	60	30.6	9.4	54.4	73.3
				19			68.8	24.6	6.6	61.4	82.9
				21			71.4	21	7.6	64.8	81.5
Siqueira dkk., 2013	Produk Susu (Holstein-Gir)	Sapi yang melahirkan	TAI	20	317	46.1	74.6	24.6	0,7	64.8	97.7
		Sapi dara			209	47.4	76.6	22.7	0,6	67.2	98
Pugliesi dkk., 2014	Daging Sapi (Nelore)	Sapi yang melahirkan	TAI	20	111	37.8	91	9	0	80.8	100
Guimarães dkk., 2015	Daging Sapi (Nelore)	Sapi yang melahirkan	TET	21	163	43.6	88.3	11.7	0	78.9	100
Scully dkk., 2014[1]	Produk susu (bos taurus)	Sapi yang melahirkan	AI setelah estrus	18	80	52.8	68.1	20.9	11.1	66.6	70.3
				19	80	56.8	82.4	13.5	4.1	79.5	88
				20	90	42.2	77.7	17.3	4.9	70.8	87.8
				21	94	45.2	87.1	11.8	1.1	78.8	97,5
Pugliesi dkk., 2018	Daging Sapi (Nelore)	Sapi yang melahirkan	TAI	22	246	49.6	94.7	5.3	0	90.4	100
		Sapi dara			231	41.6	90	10	0	80,5	100
Ataíde dkk., 2018 Andrade dkk.,	Daging Sapi (Nelore)	Sapi yang melahirkan	TET	22	221	35.5	83.8	16.2	0	68.8	100
2019 Dalmaso de Melo dkk.,	Daging Sapi (Nelore)	Sapi dara	TAI	21	113	–	87.8	12.2	0	77.3	100
2020	Daging Sapi (Nelore)	Sapi yang melahirkan	TAI	20	144	58	93	7	0	89	100
		Sapi dara			100	52	88.3	11.7	0	81.8	100
Wellert dkk., 2020	Daging Sapi (Angus-cross)	Sapi yang melahirkan	TAI	21	84	–	–	–	0	89.4	100
		Sapi dara			25				0	75	100
Dubuc dkk., 2020	Produk Susu (Holstein)	Sapi yang melahirkan	AI	21	1 632	22	62.1	37.5	0,4	52	98.1
Holton dkk., 2022a	Daging sapi (bos taurus)	Sapi yang melahirkan	TAI	20	208	52.9	87	13	0	80	100
				22	209	52.6	92	8	0	85	100
Holton dkk., 2022b	Daging sapi (bos taurus)	Sapi dara	TAI	20	183	–	90	10	0	86	100
				22		–	92	8	0	90	100
Madoz dkk., 2022	Produk Susu (Holstein)	Sapi yang melahirkan	TAI	19/20	131	37.4	74.8	24.5	0,7	60	98.2
		Sapi dara									
Ferraz dkk., 2022	Produk Susu (Holstein)	Sapi yang melahirkan	TAI	21	140	28.6	53	46.3	0,7	38	98
		Sapi dara			32	31.3	66	34	0	48	100

Singkatan: PPV = nilai prediksi positif; NPV = nilai prediksi negatif; TET = transfer embrio berjangka waktu; TAI = inseminasi buatan berjangka waktu; AI = inseminasi buatan.
[1]Penelitian ini juga mempertimbangkan tekstur uterus dan ukuran korpus luteum sebagai kriteria tambahan perfusi darah luteal untuk diagnosis hewan yang tidak hamil.



Gambar 3.Kemungkinan hasil positif palsu (betina diidentifikasi dengan CL fungsional pada hari ke 20 pasca TAI dengan ultrasonografi Doppler, namun tidak hamil pada hari ke 30) menurut CLBP pada evaluasi Doppler pada sapi potong (n = 159). Probabilitas FP = exp(0,0591x+1,4201)/1 + pengalaman(0,0591x+1.4201);P =0,008. Singkatan: CLBP = perfusi darah korpus luteum; CL = korpus luteum; FP = positif palsu; TAI = inseminasi buatan berjangka waktu.

Jadi, kemungkinan mendapatkan hasil KB lebih besar dari 25% pada wanita dengan CLBP -40%, dan kurang dari 5% pada wanita dengan CLBP 75% pada saat diagnosis kehamilan.

Dengan membandingkan hasil terkait akurasi dalam penelitian yang berbeda (Tabel 1), dimungkinkan untuk mengamati tingkat FP yang lebih besar dan nilai prediktif positif serta akurasi yang lebih rendah pada sapi perah dibandingkan dengan sapi potong, dimana keguguran biasanya lebih rendah, namun faktor lain mungkin juga terlibat seperti momen ovulasi setelah TAI dan waktu luteolisis (Reese dkk., 2020). Di sisi lain, pengaruh paritas (nulipara vs multipara) terhadap angka KB tampaknya hanya terjadi pada hewan potong. Pada produk susu, tingkat FP tidak berbeda antara sapi menyusui dan sapi dara (Siqueira dkk., 2013; Ferraz dkk., 2022) sedangkan pada daging sapi, studi (Dalmaso de Melo dkk., 2020; Holton dkk., 2022a) melaporkan peningkatan tingkat FP dan penurunan akurasi pada sapi dara dibandingkan dengan sapi yang disusui. Setidaknya diBos indikasihewan potong, perbedaan ini mungkin disebabkan oleh tertundanya luteolisis spontan pada sapi dara Nelore dibandingkan pada sapi yang disusui (Ataíde dkk., 2021).

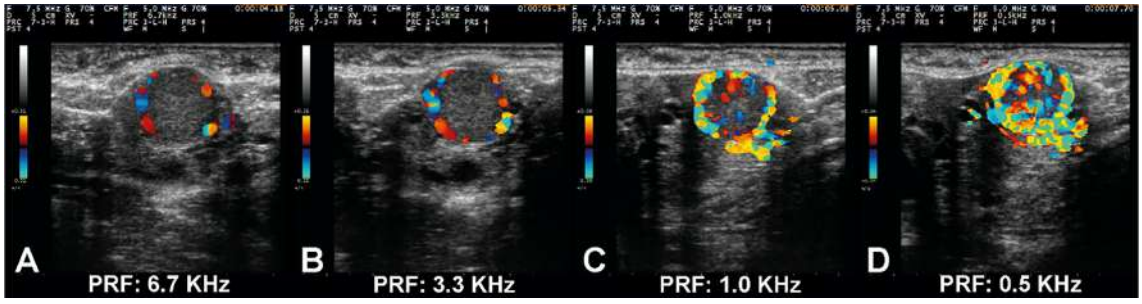
Meskipun terdapat perbedaan intrinsik yang diketahui dalam fisiologi ovarium di antara keduanyaB.indikusDanB.taurusperempuan (Sartori dkk., 2016), keakuratan diagnosis kehamilan dengan Doppler pada hari ke 20 dan 22 pasca TAI padaBos taurussapi potong (masing-masing 87 dan 92%;Holton dkk., 2022a), serupa dengan yang diamati di B.indikus (Dalmaso de Melo dkk., 2020). Terakhir, penting untuk dicatat bahwa akurasi meningkat seiring waktu setelah servis (Pugliesi dkk., 2014; Scully dkk., 2015; Siqueira dkk., 2019), terutama karena sebagian besar sapi yang tidak bunting terdeteksi di sekitar luteolisis. Dalam kasus ini,Holton dkk. (2022a)melaporkan penurunan angka KB sebesar 40% ketika diagnosis dilakukan pada hari ke-22 dibandingkan dengan hari ke-20 pasca-TAI pada sapi potong. Secara umum, penelitian telah menunjukkan bahwa diagnosis tidak hamil berdasarkan CLBF adalah metode yang layak dan akurat hanya jika dilakukan setelah hari ke 20 kebuntingan pada sapi.

Pada ruminansia kecil, penilaian CLBP subjektif menggunakan ultrasonografi Doppler warna untuk membedakan hewan bunting dan tidak bunting juga menghasilkan akurasi yang tinggi (>85%) dan NPV 100% (Arashiro dkk., 2018; Cosentino dkk., 2018). Pada kambing, Cosentino dkk. (2018)menunjukkan bahwa diagnosis kehamilan dapat dilakukan secara akurat mulai 21 hari pascakawin. Pada domba betina, periode luteolitik lebih awal dibandingkan kambing dan sapi, dan penilaian CLBP subjektif dianggap sebagai metode yang sangat efisien sejak 17 hari setelah pembiakan (Arashiro dkk., 2018).

Dalam sebagian besar penelitian, kesimpulan tentang status fungsional CL dan prediksi non-kehamilan didasarkan pada kuantifikasi area berwarna dalam gambar CL Doppler. Dalam hal ini, perbedaan pengaturan perangkat USG yang mengubah jumlah sinyal yang ditampilkan sebagai piksel berwarna berpotensi mempengaruhi keakuratan pemeriksaan yang diberikan dengan meningkatkan proporsi FP atau FN. Selama ultrasonografi Bmode, sebagian besar pengaturan (frekuensi transduser, penguatan keseluruhan, kurva skala abu-abu) dapat disesuaikan secara intuitif oleh pemeriksa berpengalaman untuk mendapatkan gambar yang jelas. Selain itu, meskipun atribut tekstur gema seperti nilai rata-rata piksel atau heterogenitas piksel dapat digunakan untuk mengevaluasi CL (Siqueira dkk., 2009a), dalam pemeriksaan ginekologi rutin, sebagian besar kesimpulan mengenai fungsi CL hanya didasarkan pada keberadaan atau ukurannya (luas atau diameter). Oleh karena itu, perbedaan kecil dalam pengaturan gambar mode B cenderung tidak mengganggu interpretasi pemindaian.

Di sisi lain, perubahan pengaturan Doppler warna mungkin berdampak lebih besar pada akurasi pemeriksaan. Frekuensi pengulangan pulsa (PRF) sangat penting karena menentukan kapasitas perangkat untuk menampilkan sinyal Doppler. Semakin tinggi PRF, semakin kecil sinyal yang ditampilkan sebagai area berwarna pada gambar (Gambar 4). Namun, penggunaan PRF yang sangat rendah (dan dengan demikian diatur ke skenario sensitivitas tinggi) dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya artefak flash karena gerakan kecil selama pemindaian, misalnya yang disebabkan oleh pernapasan (Gambar 5).

Dalam penelitian terbaru (data tidak dipublikasikan), kami memindai sapi 20 hari setelah TAI dan merekam tiga gambar dari masing-masing CL menggunakan nilai PRF masing-masing 0,7, 1,0, dan 1,5 KHz. Gambar yang disimpan kemudian digunakan untuk memprediksi status tidak hamil oleh evaluator kedua yang tidak mengetahui perbedaan PRF dan fakta bahwa lebih dari satu gambar merujuk pada sapi yang sama. Hasilnya dibandingkan dengan diagnosis kehamilan pada hari ke 30, seperti yang dijelaskan sebelumnya (Siqueira dkk., 2013). Seperti yang diharapkan, mengurangi PRF dari 1,0 menjadi 0,7 KHz (dan dengan demikian meningkatkan area berwarna pada gambar) menurunkan PPV dan spesifisitas (masing-masing 79,2 dan 72,2% vs 67,9 dan 50,0%), sedangkan meningkatkan PRF dari 1,0 menjadi 1,4 KHz menurunkan NPV dan sensitivitas (masing-masing 100 dan 100% vs 81,3 dan 84,2%). Hasil ini menunjukkan bahwa perbedaan kecil pada pengaturan Doppler dapat menyebabkan salah tafsir gambar dan, dengan demikian, keakuratan diagnosis non-kehamilan berdasarkan evaluasi warna-Doppler pada gambar.



Gambar 4.(A – D) Gambar Doppler berwarna dari CL sapi yang sama dihasilkan menggunakan penurunan nilai PRF. (A) PRF disetel pada 6,7 KHz, (B) PRF disetel pada 3,3 KHz, (C) PRF disetel pada 1,0 KHz, (D) PRF disetel pada 0,5KHz. Singkatan: CL = korpus luteum; PRF = frekuensi pengulangan pulsa.

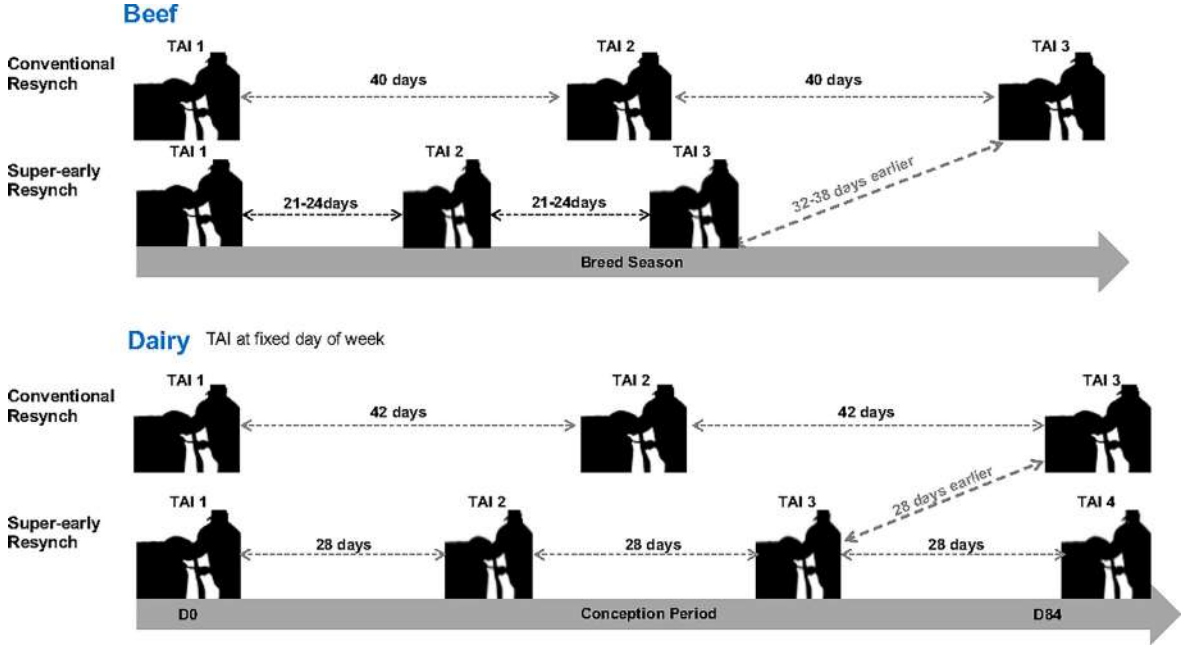
Gambar 5.(A–C) Pengaruh pergerakan selama perolehan gambar CL sapi menggunakan Doppler warna yang disetel ke nilai PRF rendah (0,5 KHz). (A) Gambar tanpa artefak flash, (B) Gambar dengan artefak minor, (C) Gambar dengan artefak besar. Singkatan: CL = korpus luteum; PRF = frekuensi pengulangan pulsa.

CLBP memerlukan penggunaan pengaturan standar yang konsisten selama ujian.

Penerapan dalam program waktu tetap pada sapi

Protokol sinkronisasi ulang memberikan peluang untuk putaran kedua TAI atau transfer embrio berjangka waktu (TET)dan dapat meningkatkan efisiensi reproduksi sapi potong dan sapi perah (Baruselli dkk., 2017). Karena tingginya efisiensi dalam mendeteksi wanita tidak hamil lebih awal dengan menggunakan pencitraan Doppler, protokol sinkronisasi ulang baru untuk mengantisipasi TAI atau TET kedua dikembangkan (Pugliesi dkk., 2018). Oleh karena itu, dimungkinkan untuk melakukan dua TAI atau TET dalam waktu 22-24 hari dibandingkan dengan 40 atau 32 hari ketika menggunakan protokol sinkronisasi ulang konvensional atau awal (Gambar 6). Untuk itu, apa yang disebut protokol sinkronisasi ulang super dini harus dimulai pada semua wanita antara 12 dan 18 hari setelah TAI atau estrus, tanpa memandang status kehamilan. Sebagai alternatif, evaluasi CLBP dapat dilakukan untuk menyinkronkan ulang hanya perempuan tanpa CL aktif. Dalam kasus ini, (Guimarães dkk., 2015) melakukan deteksi penerima yang tidak hamil dengan Doppler pada hari ke 21 setelah estrus sebelumnya (14 hari setelah TET) dan diperoleh 79,3% hewan tidak bunting yang disinkronisasi ulang lebih awal dibandingkan pengelolaan konvensional.

Permulaan protokol sinkronisasi ulang super dini dapat bervariasi sesuai dengan waktu pemeriksaan Doppler dan durasi protokol, namun biasanya mendahului periode pengenalan kehamilan oleh ibu (hari ke 12-17 setelah estrus). Oleh karena itu, hubungan obat-obatan yang digunakan untuk protokol ini tidak boleh membahayakan kehamilan yang sedang berlangsung. Mengingat estradiol terlibat dalam regresi CL (Araujo dkk., 2009), pemberian ester estradiol eksogen pada minggu kedua kehamilan masih kontroversial. Studi awal yang membandingkan penggunaan estradiol untuk menyinkronkan ulang sapi betina dari minggu kedua pasca kawin mempunyai hasil yang bervariasi menurut paritas, jenis (susu atau daging sapi), ras, dosis, dan waktu pengobatan (El-Zarkouny dan Stevenson, 2004; Colazo dkk., 2006; Machado dkk., 2008). Dalam studi pertama yang mengevaluasi hubungan sinkronisasi ulang super dini dan diagnosis Doppler, efek negatif pada tingkat kebuntingan diamati pada sapi yang menerima 1,5 mg estradiol benzoat (EB)pada hari ke 13 pasca-TAI (Vieira dkk., 2014). Di sisi lain, tidak ada dampak negatif terhadap angka kehamilan



Gambar 6.Ilustrasi skema strategi resinkronisasi super awal dibandingkan dengan resinkronisasi konvensional pada program TAI pada sapi potong dan sapi perah. Di industri susu, TAI biasanya dilakukan pada hari yang sama dalam seminggu. Sinkronisasi ulang super dini dapat dimulai 12–15 hari setelah TAI pada daging sapi dan 17–19 hari setelah TAI pada produk susu, sehingga menghasilkan interval antara TAI 21–24 hari pada daging sapi dan 28 hari pada sapi perah. Sinkronisasi ulang konvensional dilakukan setelah diagnosis kebuntingan pada hari ke 28–32 kebuntingan, menghasilkan selang waktu 40–42 hari pada ternak sapi dan sapi perah. Singkatan: TAI = inseminasi buatan berjangka waktu; Sinkronisasi ulang = sinkronisasi ulang.

diamati ketika pengobatan EB (1 mg) diberikan 13 hari setelah TAI pertama pada sapi potong (Stevenson dkk., 2003) atau sapi perah menyusui (El-Zarkouny dan Stevenson, 2004). Oleh karena itu, kelompok kami dan kelompok lainnya telah berdedikasi untuk mengembangkan strategi berbeda untuk protokol sinkronisasi ulang super-awal tanpa menggunakan EB atau membatasi penggunaannya hingga dosis maksimal 1 mg.

Pada sapi potong, penelitian awal dilakukan pada sapi dara untuk mengevaluasi penggunaan EB 1 mg (Motta dkk., 2020) dan dibandingkan dengan pemberian suntikan P4 (Vieira dkk., 2021) dalam protokol sinkronisasi ulang yang dimulai 14 hari setelah TAI. Dalam kedua penelitian, diagnosis Doppler untuk evaluasi CLBP dilakukan pada Hari ke-22 dan sapi dara yang didiagnosis tidak bunting diinseminasi ulang pada Hari ke-24 setelah TAI pertama. MeskipunMotta dkk. (2020)melaporkan bahwa pengobatan tambahan dengan estradiol atau EB yang terkait dengan perangkat P4 mengantisipasi luteolisis pada sapi dara yang tidak hamil, tidak ada perbedaan yang diamati dalam tingkat kebuntingan dari TAI pertama di antara kelompok eksperimen. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada efek berbahaya pada kehamilan yang sudah ada saat menggunakan 1 mg EB atau estradiol inBos indikasidan sapi dara persilangan. Faktanya, pengobatan tambahan dengan 1 mg EB 14 hari pasca-TAI menghasilkan angka kehamilan yang lebih besar (Motta dkk., 2020; Vieira dkk., 2021).Vieira dkk., (2021)membandingkan angka kebuntingan pada sapi dara yang disinkronisasi ulang 14 hari setelah TAI pertama menggunakan alat intravaginal P4 yang dihubungkan dengan P4 kerja lama atau EB 1 mg, dan mengamati bahwa pengobatan EB menghasilkan angka kebuntingan sinkronisasi ulang yang lebih besar dibandingkan pengobatan P4 suntik.

Sesuai dengan apa yang telah diamati pada sapi dara, Palhao dkk. (2020) melaporkan bahwa penggunaan 1 mg EB untuk menyinkronkan ulang sapi potong yang disusui pada Hari ke 13 pasca-TAI tidak menurunkan tingkat kebuntingan dibandingkan TAI pertama. Namun,Silva dkk. (2022) membandingkan penggunaan 1 atau 2 mg EB 14 hari setelah TAI dan melaporkan penurunan angka kehamilan pada TAI pertama diBos indikasi sapi potong disinkronkan ulang dengan 2 mg EB. Selain itu, sapi yang menerima EB 2 mg memiliki risiko keguguran dini dua kali lipat lebih besar dibandingkan sapi yang menerima EB 1 mg. Bersama-sama, penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan 1 mg EB yang terkait dengan perangkat P4 aman dan efisien untuk sinkronisasi super dini pada sapi dara dan sapi potong.

Karena hasil kontroversial dari penelitian pertama yang menggunakan estradiol atau EB, alternatif lain juga diselidiki. Oleh karena itu, mengingat konsentrasi P4 plasma yang tinggi berpotensi menghambat pertumbuhan hormon luteinizing dan folikel yang bergantung pada hormon perangsang folikel pada sapi (Cavalieri, 2018), efek suntikan P4 kerja pendek atau kerja panjang pada dosis berbeda telah dievaluasi untuk sinkronisasi ulang super dini pada sapi dara dan sapi (Pugliesi dkk., 2019a; Ataíde dkk., 2021). Studi yang membandingkan penggunaan atau tidak pengobatan tambahan dengan suntikan P4 dengan dosis lebih besar dari 75 mg menunjukkan efek positif pada tingkat konsepsi sapi potong dan sapi dara yang disinkronisasi ulang (Pugliesi dkk., 2019a; Ataíde dkk., 2021). Di dalam Pugliesi dkk. (2019a), interval antara TAI pertama dan kedua hanya 22 hari dan menghasilkan angka kehamilan sebesar 75% setelah dua TAI. Di dalamAtaíde dkk. (2018), Betina daging sapi Nelore dimasukkan ke dalam dua sinkronisasi ulang berturut-turut, memungkinkan tiga TAI dalam 48 hari, dan tingkat kehamilan kumulatif mencapai 83,3%. Dengan demikian, pengobatan dengan suntikan P4 dalam presentasi yang berbeda untuk sinkronisasi ulang super dini menawarkan potensi untuk meningkatkan hasil kehamilan.

Di dalamBos indikasisapi potong, dimana anestesi postpartum merupakan masalah besar, sinkronisasi ulang yang sangat dini mungkin memiliki dampak yang lebih besar pada kinerja reproduksi dibandingkan dengan sapi potong.Bos taurusras daging sapi. Penerapan protokol sinkronisasi ulang super dini berpotensi meningkatkan jumlah sapi yang bunting pada bulan pertama musim kawin, karena memungkinkan dilakukannya dua layanan (TAI atau TET) dengan interval 21 hingga 24 hari. Dalam kasus ini, Ojeda-Rojas dkk. (2021)dibandingkan menggunakan model simulasi yang berbeda. berbagai jenis strategi sinkronisasi ulang diBos indikasisapi potong dan melaporkan bahwa skenario dua TAI dalam interval 24 hari mewakili program reproduksi dengan kinerja teknis terbaik. Selain itu, tiga TAI dengan interval 24 hari menghasilkan jumlah kelahiran yang lebih banyak pada awal musim beranak dan jumlah anak sapi yang lebih banyak saat disapih, bila dibandingkan dengan hanya perkawinan alami atau strategi sinkronisasi ulang lainnya (Ojeda-Rojas dkk., 2021). Mengingat bahwa hasil ini didasarkan pada model dan bukan studi terkontrol yang sebenarnya, maka penelitian lebih lanjut untuk menyelidiki dampak sinkronisasi ulang super-awal terhadap distribusi anak sapi sangat dianjurkan. Dalam studi pendahuluan menggunakan data terkontrol (tidak dipublikasikan) yang diperoleh dari dua musim kawin berturut-turut dengan kelompok betina Nelore yang sama, kami juga mengamati proses melahirkan lebih awal setelah menggunakan tiga TAI dengan interval 24 hari. Peningkatan kelahiran sebesar 43% pada bulan pertama musim beranak (218 vs 152 kelahiran) dan peningkatan 9% dalam jumlah total anak sapi yang lahir (394 vs 361 anak sapi) diamati setelah sinkronisasi ulang super-awal diterapkan dibandingkan dengan penggunaan musim sebelumnya. hanya TAI dan banteng pembersih. Selain itu, analisis retrospektif untuk mengevaluasi distribusi pedet menunjukkan bahwa pedet yang lahir pada tiga minggu pertama musim melahirkan memiliki bobot 22 kg lebih berat dibandingkan pedet yang lahir pada tiga minggu terakhir.

Pada sapi perah, penyelidikan mengenai protokol sinkronisasi ulang super-awal masih jarang jika dibandingkan dengan sapi potong. Salah satu faktor yang berkontribusi terhadap berkurangnya jumlah penelitian di bidang produk susu dan penerapan protokol ini adalah kesesuaian diagnosis Doppler dengan jadwal kunjungan mingguan manajemen reproduksi oleh dokter hewan di operasi peternakan sapi perah (Gambar 6). Faktor lain yang perlu dipertimbangkan dalam pengembangan protokol sinkronisasi ulang pada sapi perah adalah semakin besarnya proporsi hasil KB yang dilaporkan dalam semua penelitian, terutama pada sapi perah menyusui (Siqueira dkk., 2013). Namun demikian, penelitian terbaru oleh kelompok kami (Neto dkk., 2022) melaporkan bahwa memulai sinkronisasi ulang 17 hari setelah TAI meningkatkan angka kebuntingan dalam 84 hari pertama setelah berakhirnya masa tunggu sukarela dibandingkan, dengan sinkronisasi ulang tradisional yang dimulai 31 hari setelah TAI pada sapi perah. Selain itu, penggunaan EB 1 mg yang dihubungkan dengan perangkat P4 pada awal protokol tidak berdampak pada kehamilan sejak TAI pertama dan mengurangi separuh proporsi hasil KB (sapi dengan CL fungsional pada 24 hari setelah TAI sebelumnya). Hubungan antara dosis EB rendah yang diberikan di kemudian hari dibandingkan dengan periode ibu mengetahui kehamilannya, seperti yang dilakukan olehNeto dkk. (2022) dan Freitas dkk. (2022)pada 17-19 hari setelah TAI, mungkin memiliki risiko lebih rendah untuk membahayakan kehamilan yang sudah ada karena sinyal konseptus yang lebih besar untuk mempertahankan CL tetap aktif pada periode ini. Di negara-negara di mana obat estradiol tidak diperbolehkan, sinkronisasi ulang super dini dapat dilakukan hanya dengan menggunakan perangkat P4 atau perangkat P4 yang terkait dengan P4 suntik (jika diizinkan), namun tingkat konsepsi kira-kira 12% lebih rendah bila EB atau P4 suntik tidak diperbolehkan. digunakan untuk menyinkronkan kemunculan gelombang folikuler.

Penggunaan Doppler untuk pemilihan penerima

Pemilihan penerima yang memenuhi syarat dengan benar adalah salah satu tujuan utama program transfer embrio pada sapi. Di antara beberapa karakteristik saluran reproduksi, keberadaan CL yang aktif dan jelas dianggap sebagai salah satu faktor terpenting untuk menentukan apakah penerima yang sehat harus digunakan untuk mencapai kemungkinan kehamilan yang tinggi (Phillips dan Jahnke, 2016). Biasanya, ukuran luteal dinilai dengan palpasi atau ultrasonografi skala abu-abu per rektum dan CL yang lebih besar lebih disukai daripada CL yang lebih kecil. Memilih penerima berdasarkan ukuran CL dapat mengakibatkan transfer embrio ke penerima dengan lingkungan uterus yang tidak memadai terkait dengan CL yang kurang berfungsi (Pinaffi dkk., 2015).

Memang benar, penelitian yang dirintis pada sapi (Pinaffi dkk., 2015) mengklasifikasikan sapi penerima dengan CLBP rendah (-40%) atau tinggi (>40%) pada saat transfer embrio (hari ke 7) menunjukkan tingkat kebuntingan yang jauh lebih besar pada sapi dengan CLBP tinggi dibandingkan dengan CLBP rendah (48% vs 0). %). Sesuai dengan kesepakatan, CLBP pada hari transfer embrio lebih besar pada penerima Holstein yang hamil dibandingkan penerima Holstein yang tidak hamil (Kanazawa dkk., 2016). Namun, CLBP ditentukan dalam laporan selanjutnya berdasarkan luas CLBP dan kecepatan maksimum rata-rata waktu di dasar arteri spiralis, yang mempunyai penerapan rendah dalam operasi skala besar karena memakan waktu.

Dalam hal ini, kami telah mempelajari (Pugliesi dkk., 2019b) hubungan antara karakteristik CL yang dinilai dengan ultrasonografi pada saat transfer embrio dan tingkat kebuntingan pada penerima daging sapi, menggunakan evaluasi real-time untuk menentukan CLBP. Dalam penelitian ini, kami menggunakan dua pendekatan paling praktis untuk mengevaluasi CLBP secara subyektif (yaitu, estimasi proporsi jaringan dengan sinyal berwarna [0–100%] dan sistem penilaian (digambarkan dalamGambar 1)). Dengan demikian, penerima daging sapi (n = 444) secara retrospektif dibagi menjadi tiga subkelompok menurut wilayah CL dan tiga subkelompok berdasarkan CLBP [rendah (-40%), sedang (45–50%) atau tinggi (55%)]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa CLBP yang ditentukan dengan ultrasonografi Doppler warna merupakan faktor terpenting yang dievaluasi pada transfer embrio yang mempengaruhi hasil kehamilan. Hasil kami menunjukkan hubungan positif dan linier antara proporsi CLBP dan hasil kehamilan pada penerima daging sapi yang disinkronkan. Studi terakhir (Aragon dkk., 2018; Munhoz dkk., 2018; Silva dkk., 2018) juga telah mengevaluasi CLBP menggunakan kriteria real-time yang berbeda. Meskipun tidak signifikan, tingkat kehamilan per transfer embrio pada penerima yang diklasifikasikan dengan CLBP tinggi/sangat baik adalah sekitar 1,26-2,33 kali lipat lebih besar dibandingkan dengan sapi betina dengan CLBP rendah/buruk pada sapi Holstein (42 vs 18%;Aragon dkk., 2018), sapi dan sapi dara Holstein-Gir (51,8 vs 33%;Munhoz dkk., 2018) dan sapi dara Angus (60,6 vs 48,1%;Silva dkk., 2018).

Konsisten dengan hasil pada ternak, kelompok kami (Morelli dkk., 2022) baru-baru ini mendeteksi bahwa CLBP pada kuda penerima adalah satu-satunya karakteristik sonografi luteal yang mempengaruhi pembentukan kehamilan setelah pemindahansecara alamiembrio kuda (CLBP rendah: 65,5% [38/58] vs CLBP tinggi: 88,4% [38/43]). Hal ini juga mencerminkan peningkatan progresif angka kehamilan yang terkait dengan peningkatan CLBP. Selain itu, pada kerbau, tingkat kebuntingan 2,5 kali lipat lebih besar pada penerima dengan CLBP tinggi (50%) dibandingkan penerima dengan CLBP rendah (<50%) pada saat transfer embrio (Silva dkk., 2018). Hal ini menunjukkan bahwa CLBP dapat digunakan sebagai kriteria utama untuk memilih penerima yang sangat reseptif terhadap spesies hewan besar yang berbeda.

Mengingat jumlah penerima pada saat transfer embrio dalam program waktu tetap pada sapi terbatas dan biasanya lebih sedikit dibandingkan jumlah embrio, salah satu strategi penggunaan Doppler dalam seleksi penerima adalah dengan menolak sapi betina dengan CL yang non-fungsional namun teraba. Ini mewakili 9,5% betina yang membawa CL pada saat transfer embrio (Pugliesi dkk., 2019b). Selain itu, jika jumlah penerima yang tersedia berlebihan, evaluasi CLBP dapat digunakan untuk memprioritaskan transfer embrio hanya ke penerima dengan CLBP sedang atau tinggi (>40%). Akibatnya, embrio tidak akan ditransfer ke wanita dengan CL non-atau subfungsional yang diidentifikasi dengan pencitraan Doppler (Pugliesi dkk., 2019b). Sebagai alternatif, embrio dengan nilai generik yang tinggi dapat ditransfer ke penerima yang diberi peringkat CLBP tinggi.

Meskipun semua penelitian telah menunjukkan efek positif yang sama dari CLBP terhadap tingkat kehamilan penerima, mekanisme yang terkait dengan efek ini dalam mendukung pembentukan kehamilan masih belum sepenuhnya dipahami. Hipotesis bahwa CLBP yang tinggi dapat dikaitkan dengan efek embriotropik dari P4 yang bersirkulasi selama perkembangan embrio tampaknya tidak didukung oleh hasil penelitian terbaru, karena korelasi dengan P4 yang bersirkulasi lemah untuk CLBP dan sedang atau kuat untuk ukuran luteal pada awal diestrus (Rocha dkk., 2019). Selain itu, Siqueira dkk. (2009a dan 2009b) dan Chagas e Silva dkk. (2002)mengamati bahwa konsentrasi P4 yang bersirkulasi pada hari transfer embrio memiliki kegunaan praktis yang terbatas untuk seleksi penerima pada sapi perah dan daging. Alternatifnya, peningkatan CLBP dapat dikaitkan dengan resistensi CL yang lebih besar untuk mengalami regresi atau dengan vaskularisasi yang lebih besar pada saluran reproduksi. Namun hipotesis alternatif ini masih harus diselidiki dalam penelitian lebih lanjut untuk pemahaman yang lebih baik tentang mekanisme yang terlibat dalam efek positif CLBP terhadap pembentukan kebuntingan pada sapi.

Pertimbangan terakhir

Selama beberapa dekade terakhir, pengetahuan kumulatif tentang CLBP yang ditentukan oleh ultrasonografi Doppler warna menunjukkan bahwa karakteristik luteal ini merupakan alat praktis dan real-time untuk mengevaluasi fungsi CL. Berdasarkan tingginya korelasi antara P4 vs CLBP yang bersirkulasi dibandingkan dengan ukuran P4 vs CL, maka evaluasi CLBP pada fase regresi luteal digunakan untuk mengantisipasi terdeteksinya sapi tidak bunting pada program TAI dan TET. Beberapa penelitian telah menggunakan evaluasi CLBP secara subjektif dan real-time pada sapi potong dan sapi perah. Metode ini menunjukkan akurasi yang tinggi dan hasil negatif palsu yang rendah atau mendekati nol, dan akibatnya, NPV yang sangat tinggi. Pada sapi betina, ketika diagnosis dilakukan 20-22 hari pasca-TAI, akurasi dibandingkan dengan diagnosis standar emas pada hari ke-30 kehamilan melebihi 90%.

Meskipun penilaian CLBP dapat mendeteksi wanita tidak hamil, fungsi CL bukanlah penanda kehamilan yang spesifik; oleh karena itu, sebagian besar hasil positif palsu (12-30%) dapat terjadi, terutama pada sapi perah dan sapi dara. Deteksi ketidak-kehamilan dengan evaluasi CLBP lebih awal dibandingkan metode konvensional (visualisasi embrio dan detak jantung) memungkinkan pengembangan strategi baru sinkronisasi ulang ovulasi dengan cara yang sangat dini, sehingga menghasilkan kemungkinan dua layanan (TAI atau TET) dalam interval 22 hingga 24 hari. Perlu disebutkan bahwa metode untuk mengevaluasi CLBP dan penerapan praktisnya mendorong penggunaan komersial USG Doppler untuk deteksi dini sapi betina yang tidak hamil dengan cara yang belum pernah terjadi sebelumnya dan menjadi pionir di Amerika Selatan, terutama di Brasil. Akhirnya, CLBP yang lebih besar pada hari transfer embrio pada calon betina hamil dan temuan lain yang menunjukkan bahwa CLBP mungkin merupakan indikator aktivitas luteal yang lebih baik dalam penelitian pada sapi dan kuda menunjukkan bahwa evaluasi CLBP pada transfer embrio adalah informasi yang lebih berharga untuk diperkirakan. kemungkinan keberhasilan kehamilan dibandingkan konsentrasi P4 sistemik pada penerima embrio. Namun perlu dicatat bahwa untuk memperoleh kemajuan besar ini, diperlukan pelatihan dan pemahaman tentang prinsip-prinsip dan peralatan pencitraan, karena pengaturan perangkat harus diatur dengan benar dan operator sangat siap untuk melakukan penilaian dengan benar.

Persetujuan etika

Penulis tidak menggunakan hewan hidup apa pun untuk melakukan tinjauan ini.

Pernyataan ketersediaan data dan model

Data atau model tidak disimpan di repositori resmi. Tidak ada kumpulan data baru yang dibuat.

Penulis ORCID

Guilherme Pugliesi:https://orcid.org/0000-0001-5739-0677. Amanda Guimaraes Silva:https://orcid.org/0000-0003-0918-4208.

Joao HM Viana:https://orcid.org/0000-0002-3742-2368.

Luiz Gustavo B.Siqueira:https://orcid.org/0000-0002-2800-5829.

Kontribusi penulis

Guilherme Pugliesi:konseptualisasi, penulisan draf asli, review dan editing.
Amanda Guimaraes Silva:menulis draf asli, review dan editing.

Joao HM Viana:konseptualisasi, penulisan draf asli, dan penyuntingan.
Luiz Gustavo B.Siqueira:konseptualisasi, penulisan draf asli, dan penyuntingan.

Pernyataan minat

Para penulis telah menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan.

Ucapan Terima Kasih

Tidak ada.

Pernyataan dukungan keuangan

Pekerjaan ini didukung oleh lembaga pendanaan: São Paulo Research Foundation (FAPESP), Proyek Dewan Nasional Pengembangan Teknologi dan Ilmiah (CNPq) 422372/2018-8, dan Koordinasi Peningkatan Tenaga Pendidikan Tinggi – Brasil (CAPES) .

Deklarasi Transparansi

Artikel ini merupakan bagian dari suplemen berjudul Kuliah Utama dari Simposium Reproduksi Ruminansia Internasional ke-11 yang didukung oleh British Society of Animal Science.

Referensi

Acosta, TJ, Miyamoto, A., 2004. Kontrol vaskular fungsi ovarium: Ovulasi, pembentukan dan regresi korpus luteum. Ilmu Reproduksi Hewan 82–83, 127–140. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.022.

Andrade, JPN, Andrade, FS, Guerson, YB, Domingues, RR, Gomez-León, VE, Cunha, TO, Jacob, JCF, Sales, JN, Martins, JPN, Mello, MRB, 2019. Diagnosis kebuntingan dini pada 21 hari pasca inseminasi buatan menggunakan perfusi pembuluh darah korpus luteum dibandingkan dengan diameter korpus luteum dan/atau ekogenisitas pada sapi dara Nelore. Ilmu Reproduksi Hewan 209,.https://doi.org/10.1016/j. anireprosci.2019.106144106144.

Aragon, FALF, Rezende, RG, Soriano, S., Sica, AF, Abreu, L., Mingoti, R., Elliff, FM, Zanatta, G., Baruselli, PS, 2018. Faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat konsepsi terhadap FTET penerima Holstein dievaluasi dengan USG Color Doppler. Reproduksi Hewan (Abstrak) 15, 351.

Arashiro, EKN, Palhao, MP, Santos, JRL, Fontes, RC, Siqueira, LGB, Henry, M., Viana, JHM, 2013. Pemodelan tiga dimensi gambar Doppler berwarna: pendekatan baru untuk mempelajari vaskularisasi folikel pada sapi. Reproduksi Hewan 10, 662–669.

Arashiro, EKN, Ungerfeld, R., Clariget, RP, Pinto, PHN, Balaro, MFA, Bragança, G. M., Ribeiro, LS, da Fonseca, JF, Brandão, FZ, 2018. Diagnosis kehamilan dini pada domba betina dengan penilaian subjektif vaskularisasi luteal menggunakan ultrasonografi Doppler berwarna. Teriogenologi 106, 247–252.https://doi.org/10.1016/j. theriogenologi.2017.10.029.

Araujo, RR, Ginther, OJ, Ferreira, JC, Palhão, MM, Beg, MA, Wiltbank, MC, 2009. Peran estradiol-17beta folikel dalam waktu luteolisis pada sapi dara. Biologi Reproduksi 81, 426–437.https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073825. Ataíde, GA, Pellegrino, CAG, Claro Jr, I., Meneghetti, M., Grázia, JG, Góis, ACN, Gonçalves, F., Torres, F., Vasconcelos, JLM, Pugliesi, G., 2018. Eficácia da Ultrassonografia Doppler untuk mendeteksi tidak ada aktivitas dalam liburan korteks reseptor. Dalam: Prosiding Pertemuan Tahunan ke-32 Masyarakat Teknologi Embrio Brasil (SBTE), 16 hingga 18 Agustus 2018, Florianópolis, SC, Brasil, hal.177–178.

Ataíde, GA, Kloster, A., Moraes, É.G., Motta, IG, Junior, IC, Vasconcelos, LM, Assis, P., Paula, GD, Pugliesi, G., 2021. Sinkronisasi awal munculnya gelombang folikular pada sapi Nelore menggunakan progesteron suntik dan intravaginal untuk tiga kali inseminasi buatan. Ilmu Reproduksi Hewan 229,. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106759106759.

Balaro, MFA, Santos, AS, Moura, LFGM, Fonseca, JF, Brandão, FZ, 2017. Luteal penilaian dinamis dan fungsionalitas pada kambing perah dengan aliran darah luteal, biometri luteal, dan uji hormonal. Teriogenologi 95, 118–126.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.02.021.

Baruselli, PS, Ferreira, RM, Colli, MHA, Elliff, FM, Sá Filho, MF, Vieira, L., Freitas, BG, 2017. Inseminasi buatan berjangka waktu: Tantangan saat ini dan kemajuan terkini dalam efisiensi reproduksi pada peternakan sapi potong dan susu di Brasil. Reproduksi Hewan 14, 558–571.https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR999. Bollwein, H., Heppelmann, M., Lüttgenau, J., 2016. Penggunaan Doppler Ultrasonografi untuk Manajemen Reproduksi Wanita. Klinik Hewan Amerika Utara - Praktek Makanan Hewan 32, 149–164.https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2015.09.005. Cavalieri, J., 2018. Pengaruh perlakuan sapi dara Bos indicus dengan progesteron 0, 3 dan 6 hari setelah aspirasi folikel mengenai dinamika folikel dan waktu estrus dan ovulasi. Ilmu Reproduksi Hewan 193, 9–18.https://doi.org/ 10.1016/j.anireprosci.2018.03.026.

Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Robalo Silva, J., 2002. Progesteron plasma profil dan faktor yang mempengaruhi kematian embrio-janin setelah transfer embrio pada sapi perah. Teriogenologi 58, 51–59.https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00906-8.

Colazo, MG, Kastelic, JP, Mainar-Jaime, RC, Gavaga, QA, Whittaker, PR, Kecil, J. A., Martinez, MF, Wilde, RE, Veira, DM, Mapletoft, RJ, 2006. Sinkronisasi ulang sapi dara yang diinseminasi sebelumnya dengan progestin. Teriogenologi 65, 557–572. https://doi.org/10.1016/j. theriogenologi.2005.06.001.

Cosentino, IO, Balaro, MFA, Leal, FSC, da Silva Carvalho, AB, Cortat de Souza, PR, Arashiro, EKN, Brandão, FZ, 2018. Keakuratan penilaian morfologi luteal dan aliran darah luteal untuk prediksi kebuntingan dini pada kambing. Teriogenologi 121, 104–111.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.007.

Dalmaso de Melo, G., Mello, BP, Ferreira, CA, Souto Godoy Filho, CA, Rocha, CC, Silva, AG, Reese, ST, Madureira, EH, Pohler, KG, Pugliesi, G., 2020. Penerapan penggunaan ekspresi gen stimulasi interferon-tau dalam sel polimorfonuklear untuk mendeteksi kebuntingan dibandingkan dengan prediktor awal lainnya pada sapi potong. Teriogenologi 152, 94–105. https://doi.org/10.1016/j.theriogenologi.2020.04.001.

Dubuc, J., Houle, J., Rousseau, M., Roy, JP, Buczinski, S., 2020. Komunikasi singkat: Keakuratan ultrasonografi Doppler aliran warna korpus luteum untuk mendiagnosis tidak hamil pada sapi perah pada hari ke 21 setelah inseminasi. Jurnal Ilmu Susu 103, 2019–2023.https://doi.org/10.3168/jds.2019-17234. El-Zarkouny, SZ, Stevenson, JS, 2004. Sinkronisasi ulang estrus dengan progesteron atau progesteron plus estrogen pada sapi yang status kebuntingannya tidak diketahui. Jurnal Ilmu Susu 87, 3306–3321.https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04) 73467-0.

Ferraz, PA, Poit, DAS, Neto, AL, Luiz, F., Azrak, AJ, Carneiro, AL., Pardo, FJD, Pohler, KG, Baruselli, PS, Pugliesi, G., 2022. Penentuan keguguran pada berbagai momen awal kebuntingan pada sapi perah yang dilakukan TAI. Reproduksi Hewan (Abstrak) 19, 22136.

Fraser, HM, Wulff, C., 2003. Angiogenesis pada korpus luteum. Reproduksi Biologi dan Endokrinologi 1, 1–8.https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-88. Freitas, BG, Machado, R., Lima, B., Catussi, C., Carolina, A., Motta, IG, 2022. Efisiensi suntikan P4 atau EB pada awal protokol sinkronisasi ulang (19 hari setelah TAI) pada sapi perah menyusui. Reproduksi Hewan (Abstrak) 19, 22063.

Ginther, OJ (Ed.), 2007. Pencitraan Ultrasonik dan Reproduksi Hewan: Warna-Ultrasonografi Doppler. Penerbitan Equiservices, Cross Plains, WI, AS. Gnemmi, GM, Maraboli, CVA, Gnemmi, B., Saleri, R., De Rensis, F., 2022. Penggunaan dan kecukupan diagnosis non-kehamilan pada sapi. Masa depan yang mana? Reproduksi pada Hewan Domestik 57, 45–52.https://doi.org/10.1111/rda.14206. Guimarães, CRB, Oliveira, SAYA, Rossi, JR, Fernandes, CAC, Viana, JHM, Palhao, MP, 2015. Evaluasi aliran darah Corpus luteum pada Hari ke-21 untuk meningkatkan pengelolaan kawanan penerima embrio. Teriogenologi 84, 237–241.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.005.

Herzog, K., Bollwein, H., 2007. Penerapan ultrasonografi Doppler pada sapi reproduksi. Reproduksi pada Hewan Domestik 42, 51–58.https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00903.x.

Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H., 2010. Aliran darah luteal merupakan indikator yang lebih tepat untuk fungsi luteal selama siklus estrus sapi dibandingkan ukuran luteal. Teriogenologi 73, 691–697.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.016.

Herzog, K., Voss, C., Kastelic, JP, Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H., 2011. Aliran darah luteal meningkat selama tiga minggu pertama kebuntingan pada sapi perah menyusui. Teriogenologi 75, 549–554.https://doi.org/10.1016/j.theriogenologi.2010.09.024.

Holton, MP, Dalmaso, G., Dias, NW, Pancini, S., Lamb, GC, Pohler, KG, dkk., 2022a. Diagnosis kebuntingan dini pada sapi dara pengganti Bos taurus menggunakan ultrasonografi Doppler warna. Jurnal Ilmu Hewan 100, 12.https://doi.org/10.1093/jas/skac028.023.

Holton, MP, Oosthuizen, N., de Melo, GD, Davis, DB, Stewart Jr., RL, Pohler, KG, Domba, GC, Font, PLP, 2022b. Ultrasonografi doppler warna luteal dan glikoprotein terkait kehamilan sebagai alat diagnostik awal kehamilan dan prediktor keguguran pada sapi potong pasca melahirkan Bos taurus. Jurnal Ilmu Hewan 100, 1–9.https://doi.org/10.1093/jas/skac018.

Honnens, A., Voss, C., Herzog, K., Niemann, H., Rath, D., Bollwein, H., 2008. Rahim aliran darah selama 3 minggu pertama kebuntingan pada sapi perah. Teriogenologi 70, 1048–1056.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.022.

Kanazawa, T., Seki, M., Ishiyama, K., Kubo, T., Kaneda, Y., Sakaguchi, M., Izaike, Y., Takahashi, T., 2016. Prediksi kebuntingan pada hari transfer embrio (Hari ke 7) dan Hari ke 14 dengan mengukur aliran darah luteal pada sapi perah. Teriogenologi 86, 1436–1444.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.001.

Kastelic, JP, Bergfelt, DR, Ginther, OJ, 1991. Deteksi ultrasonik pada konseptus dan karakterisasi cairan intrauterin pada Hari ke 10 sampai ke 22 pada sapi dara. Teriogenologi 35, 569–581.https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90453-K. Lonergan, P., 2011. Pengaruh progesteron terhadap kualitas oosit dan embrio perkembangan pada sapi. Teriogenologi 76, 1594–1601.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.012.

Macchiarelli, G., Nottola, SA, Picucci, K., Stallone, T., Motta, PM, 1998. mikrovaskular korpus luteum pada kelinci hamil. Sebuah studi pemindaian mikroskop elektron dari cetakan korosi. Jurnal Anatomi dan Embriologi Italia 103, 191–202http://europepmc.org/abstract/MED/11315950.

Machado, R., Bergamaschi, MACM, Barbosa, RT, Madureira, EH, Alencar, MM, Binelli, M., 2008. Taxas de service, concepção and prenhez de vacas nelore tratdas com gonadotrofina coriônica humana dan 17beta-estradiol após a inseminação buatan dalam waktu tetap. Jurnal Penelitian Kedokteran Hewan dan Ilmu Hewan Brasil 45, 221.https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456. bjvras.2008.266700.

Madoz, LV, Lorenti, SN, Rearte, R., Quintero-Rodriguez, L., Migliorisi, AL, Jaureguiberry, M., Gabler, C., Drillich, M., de la Sota, RL, RL, 2022. Deteksi sapi tidak hamil dan potensi kehilangan embrio dengan USG Doppler warna dan ekspresi gen yang distimulasi interferon pada sapi perah yang digembalakan. Jurnal Ilmu Susu 105, 6973–6984.https://doi.org/10.3168/jds.2021-21171. Mann, GE, Lamming, GE, 1995. Penghambatan perkembangan progesteron sinyal luteolitik pada sapi. Jurnal Reproduksi dan Kesuburan 104, 1–5. Matsui, M., Miyamoto, A., 2009. Evaluasi aliran darah ovarium berdasarkan warna Doppler USG: Penggunaan praktis untuk manajemen reproduksi pada sapi. Jurnal Kedokteran Hewan 181, 232–240.https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.027. Miyazaki, T., Tanaka, M., Miyakoshi, K., Minegishi, K., Kasai, K., Yoshimura, Y., 1998. Ultrasonografi Doppler kekuatan dan warna untuk evaluasi pembuluh darah korpus luteum manusia. Reproduksi Manusia 13, 2836–2841.https://doi. org/10.1093/humrep/13.10.2836.

Morelli, KG, Lourenço, GG, Marangon, VR, Oshiro, TSI, Silva, IVR, Schmidek, A., Resende, FD, Pugliesi, G., 2022. Apakah ultrasonografi Doppler untuk pemilihan penerima meningkatkan keberhasilan kehamilan dalam program transfer embrio kuda? Reproduksi Hewan (Abstrak) 19, 22081.

Motta, IG, Rocha, CC, Bisinotto, DZ, Melo, GD, Ataide Júnior, GA, Silva, AG, Gonzaga, VHG, Santos, JA, Freitas, BG, Lemes, KM, Madureira, EH, Pugliesi, G., 2020. Peningkatan angka kebuntingan pada sapi dara yang disinkronisasi ulang dengan estradiol pada 14 hari setelah TAI. Teriogenologi 147, 62–70.https://doi.org/10.1016/j. theriogenologi.2020.02.009.

Munhoz, AK, Pereira, MHC, Vasconcelos, JLM, 2018. Tingkat konsepsi menurut untuk vaskularisasi korpus luteum pada sapi penerima embrio dan sapi dara. Reproduksi Hewan (Abstrak) 15, 342.

Nation, DP, Malmo, J., Davis, GM, Macmillan, KL, 2003. Ultrasonografi pada usia 28 hingga 35 hari setelah inseminasi. Jurnal Kedokteran Hewan Australia 81, 63–65.

Neto, AL, Bisinotto, DZ, Poit, DAS, Ferraz, PA, Silva, FM, Ferreira, WDA, Azrak, AJ, Pugliesi, G., 2022. Dampak terhadap outcome kebuntingan dalam mengantisipasi sinkronisasi ovulasi dengan deteksi dini pada sapi perah tidak bunting. Reproduksi Hewan (Abstrak) 19, 22053.

Niswender, GD, Nett, TM, Diekman, MAA, Fort, C., State, P., 1975. Aliran darah ke ovarium domba betina sepanjang siklus estrus. Biologi Reproduksi 13, 381–388.

Niswender, GD, Juengel, JL, Silva, PJ, Rollyson, MK, McIntush, EW, 2000. Mekanisme yang mengendalikan fungsi dan masa hidup korpus luteum. Tinjauan Fisiologis 80, 1–29.https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1. Ojeda-Rojas, OA, Gonella-Diaza, AM, Bustos-Coral, D., Sartorello, GL, Reijers, TS SS, Pugliesi, G., Zerlotti Mercadante, ME, de Lima, CG, Gameiro, AH, 2021. Model simulasi berbasis agen untuk membandingkan berbagai strategi reproduksi dalam operasi anak sapi: Kinerja teknis. Teriogenologi 160, 102–115. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.035.

Palhão, MP, Ribeiro, AC, Martins, AB, Guimarães, CRB, Alvarez, RD, Seber, MF, Fernandes, CAC, Neves, JP, Viana, JHM, 2020. Sinkronisasi dini sapi potong tidak bunting berdasarkan evaluasi aliran darah corpus luteum 21 hari setelah Timed-AI. Teriogenologi 146, 26–30.https://doi.org/10.1016/j. theriogenologi.2020.01.064.

Pate, JL, 1994. Komponen seluler terlibat dalam luteolisis. Jurnal Hewan Sains 72, 1884–1890.https://doi.org/10.2527/1994.7271884x.

Phillips, PE, Jahnke, MM, 2016. Transfer embrio (teknik, donor, dan penerima).klinik hewan di Amerika Utara.Praktek Makanan Hewan 32, 365–385. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.008.

Pieterse, MC, Taverne, MA, Kruip, TA, Willemse, AH, 1990. Deteksi corpora lutea dan folikel pada sapi: perbandingan ultrasonografi transvaginal dan palpasi rektal. Catatan Kedokteran Hewan 126, 552–554http://europepmc.org/ abstract/MED/2368295.

Pinaffi, FLV, Santos, É.S., da Silva, MG, Maturana Filho, M., Madureira, EH, Silva, L. A., Pinaffi, FLV, Santos, É.S., da Silva, MG, Maturana Filho, M., Madureira, EH, Silva, LA, 2015. Ukuran dan vaskularisasi folikel dan korpus luteum sebagai prediktor kesuburan pada saat inseminasi buatan dan transfer embrio pada sapi potong. Pesquisa Veterinaria Brasileira 35, 470–476.https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000500015.

Pugliesi, G., Pinaffi, FLV, Beg, MA, Ginther, OJ, 2013. Pemanfaatan area corpus luteum sebagai prediktor luteolisis fungsional yang sedang berlangsung pada sapi perah. Reproduksi, Kesuburan dan Perkembangan 25, 235.https://doi.org/10.1071/RDv25n1Ab173.

Pugliesi, G., Miagawa, BT, Paiva, YN, França, MR, Silva, LA, Binelli, M., 2014. Perubahan yang disebabkan oleh konseptus pada ekspresi gen sel kekebalan darah dan fungsi luteal yang diakses dengan USG pada sapi potong: Seberapa dini kita dapat mendeteksi kehamilan? Biologi Reproduksi 91, 1–12.https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121525.

Pugliesi, G., de Melo, GD, Ataíde, GA, Pellegrino, CAG, Silva, JB, Rocha, CC, Motta, IG, Vasconcelos, JLM, Binelli, M., 2018. Penggunaan ultrasonografi Doppler dalam program transfer embrio: Kelayakan dan hasil lapangan. Reproduksi Hewan 15, 239–246.https://doi.org/10.21451/1984-3143- AR2018-0059.

Pugliesi, G., Bisinotto, DZ, Mello, BP, Lahr, FC, Ferreira, CA, Melo, GD, Bastos, M. R., Madureira, EH, 2019a. Sebuah strategi baru untuk sinkronisasi ulang ovulasi pada sapi Nelore menggunakan alat pelepas progesteron (P4) dan P4 yang dapat disuntikkan untuk melakukan dua inseminasi dalam waktu 22 hari. Reproduksi Hewan Domestik 54, 1149–1154.https://doi.org/10.1111/rda.13475.

Pugliesi, G., de Melo, GD, Silva, JB, Carvalhêdo, AS, Lopes, E., de Siqueira Filho, E., Silva, LA, Binelli, M., 2019b. Penggunaan ultrasonografi Doppler warna untuk pemilihan penerima dalam program transfer embrio berjangka waktu pada sapi potong. Teriogenologi 135, 73–79.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.006.

Reese, ST, Franco, GA, Poole, RK, Hood, R., Fernadez Montero, L., Oliveira Filho, R. V., Cooke, RF, Pohler, KG, 2020. Kehilangan kebuntingan pada sapi potong: Sebuah meta-analisis. Ilmu Reproduksi Hewan 212,.https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106251106251.

Rocha, CC, Martins, T., Cardoso, BO, Silva, LA, Binelli, M., Pugliesi, G., 2019. Titik akhir ukuran luteal yang diakses dengan ultrasonografi yang paling erat hubungannya dengan sirkulasi progesteron selama siklus estrus dan awal kebuntingan pada sapi potong. Ilmu Reproduksi Hewan 201, 12–21.https://doi.org/10.1016/j. anireprosci.2018.12.003.

Sartori, R., Gimenes, LU, Monteiro, PLJ, Melo, LF, Baruselli, PS, Bastos, MR, 2016. Perbedaan metabolik dan endokrin antara Bos taurus dan Bos indicus betina yang berdampak pada interaksi nutrisi dengan reproduksi. Teriogenologi 86, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.theriogenologi.2016.04.016.

Scully, S., Evans, ACO, Duffy, P., Crowe, MA, 2014. Karakterisasi folikel dan Pengembangan CL pada sapi dara menggunakan ultrasonografi tiga dimensi resolusi tinggi. Teriogenologi 81, 407–418.https://doi.org/10.1016/j.theriogenologi.2013.10.012.

Scully, S., Evans, ACO, Carter, F., Duffy, P., Lonergan, P., Crowe, MA, 2015. Pemantauan ultrasonografi terhadap aliran darah dan tekstur gema korpus luteum dan rahim selama awal kebuntingan sapi dara. Teriogenologi 83, 449–458. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.009.

Silva, AG, Nishimura, TK, Rocha, CC, Motta, IG, Laurindo Neto, A., Ferraz, PA, Bruni, GA, Orlandi, RE, Massoneto, JPM, Pugliesi, G., 2022. Perbandingan dosis estradiol benzoat untuk sinkronisasi ulang ovulasi 14 hari setelah timed-AI pada sapi potong. Teriogenologi 184, 41–50.https://doi.org/ 10.1016/j.theriogenology.2022.02.025.

Silva, A., Veiga, P., Castro, T., Bartolomé, J., Wallace, SP, 2018. Mode Doppler Warna Ultrasonografi untuk pemilihan penerima embrio Angus. Reproduksi Hewan (Abstrak) 15, 371.

Silva, JCB, 2020. Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na produção in vitro embrio dan konsep konsep pemanfaatan embrio yang diawetkan. Dalam: Prosiding Pertemuan Tahunan XXXIII Masyarakat Teknologi Embrio Brasil (SBTE), 15 hingga 18 Agustus 2018, Ilha de Comandatuba, BA, Brazil, hal.28.

Siqueira, LGB, Torres, CAA, Amorim, LS, Souza, ED, Camargo, LSA, Fernandes, CAC, Viana, JHM, 2009a. Keterkaitan antara morfologi, tekstur gema, dan fungsi korpus luteum sapi selama siklus estrus. Ilmu Reproduksi Hewan115, 18–28.https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.11.009.

Siqueira, LGB, Torres, CAA, Souza, ED, Monteiro, PLJ, Arashiro, EKN, Camargo, LSA, Fernandes, CAC, Viana, JHM, 2009b. Tingkat kebuntingan dan faktor-faktor terkait korpus luteum yang mempengaruhi pembentukan kebuntingan pada penerima sapi disinkronkan untuk transfer embrio dalam waktu tetap. Teriogenologi 72, 949–958. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.06.013.

Siqueira, LGB, Area, VS, Ghetti, AM, Fonseca, JF, Palhao, MP, Fernandes, CAC, Viana, JHM, 2013. Pencitraan aliran Color Doppler untuk deteksi dini sapi tidak bunting pada 20 hari setelah waktu inseminasi buatan. Jurnal Ilmu Susu 96, 6461–6472.https://doi.org/10.3168/jds.2013-6814.

Siqueira, LGB, Arashiro, EK, Ghetti, AM, Souza, ED, Feres, LF, Pfeifer, LF, Fonseca, JF, Viana, JH, 2019. Gambaran vaskular dan morfologi korpus luteum 12 hingga 20 hari setelah waktu inseminasi buatan pada sapi perah. Jurnal Ilmu Susu 102, 5612–5622.https://doi.org/10.3168/jds.2018-15853.

Stevenson, JS, Johnson, SK, Medina-Britos, MA, Richardson-Adams, AM, Lamb, GC, 2003. Sinkronisasi ulang estrus pada sapi yang tidak diketahui status kebuntingannya menggunakan estrogen, progesteron, atau keduanya. Jurnal Ilmu Hewan 81, 1681–1692. https://doi.org/10.2527/2003.8171681x.

Tom, JW, Pierson, RA, Adams, GP, 1998. Analisis gema tekstur kuantitatif sapi corpora lutea. Teriogenologi 49, 1345–1352.https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00081-8.

Utt, MD, Johnson, GL, Beal, WE, 2009. Evaluasi darah korpus luteum aliran menggunakan USG Doppler aliran warna untuk diagnosis awal kehamilan pada penerima embrio sapi. Teriogenologi 71, 707–715.https://doi.org/ 10.1016/j.theriogenology.2008.09.032.

Viana, JHM, Arashiro, EKN, Siqueira, LGB, Ghetti, AM, Area, VS, Guimarães, C. RB, 2013. Ultrasonografi Doppler sebagai alat penatalaksanaan ovarium. Reproduksi Hewan 10, 215–222.

Vieira, CC, Pinto, HF, Buss, V., Gonzalez de Freitas, B., Guerreiro, BM, Leivas, FG, Pugliesi, G., Mesquita, FS, 2021. Sinkronisasi gelombang folikuler menggunakan suntikan progesteron atau estradiol benzoat kerja panjang pada 14 hari pasca TAI pada sapi dara Bos taurus x Bos indicus. Teriogenologi 176, 194–199.https://doi. org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.017.

Vieira, LM, Sá Filho, MF, Pugliesi, G., Guerreiro, BM, Cristaldo, MA, Batista, EOS, Freitas, BG, Carvalho, FJ, Guimaraes, LHC, Baruselli, PS, 2014. Sinkronisasi ulang pada sapi perah 13 hari setelah TAI dilanjutkan dengan diagnosis kebuntingan berdasarkan vaskularisasi korpus luteum dengan color doppler. Reproduksi Hewan (Abstrak) 11, 378.

Wellert, SR, Battista, SE, Kieffer, J., Lurch, RN, Garcia-Guerra, A., 2020. Perbandingan setting USG Doppler yang berbeda untuk diagnosis kebuntingan berdasarkan perfusi korpus luteum 21 hari setelah IB pada sapi potong. Reproduksi, Kesuburan dan Perkembangan 32, 211.https://doi.org/10.1071/RDv32n2Ab168.

dokter hewan
ilmu pengetahuan

MDPI

Tinjauan Sistematis

Dampak Aksesori Corpus Luteum yang Diinduksi oleh Gonadotropin-Releasing Hormone atau Human Chorionic Gonadotropin terhadap Tingkat Kebuntingan Sapi Perah setelah Transfer Embrio: Analisis META

Fang Chen[1], Yi'an Hou[1], Xiaoqing Zhu[2], Cheng Mei[3], Rihong Guo[1,4,*] dan Zhendan Shi[1,5,*]

[1] Institut Ilmu Hewan, Akademi Ilmu Pertanian Jiangsu, Nanjing 210014, Pusat Pengembangan Industri
[2] Sains dan Teknologi Tiongkok, Sekolah Tinggi Kedokteran dan Farmasi Chongqing, Chongqing 401331, Tiongkok
[3] Dongying Austasia Modern Dairy Farm Co., Ltd., Dongying 257345, Cina
[4] Laboratorium Utama Pertanian Terpadu Tanaman dan Hewan, Kementerian Pertanian, Nanjing 210014, Tiongkok
[5] Laboratorium Utama Jiangsu untuk Kualitas dan Keamanan Pangan-Pangkalan Budidaya Laboratorium Utama Kementerian Sains dan Teknologi, Akademi Ilmu Pengetahuan Pertanian Jiangsu, Nanjing 210014, Tiongkok
* Korespondensi: rhguo@jaas.ac.cn (RG); zdshi@jaas.ac.cn (ZS)

Ringkasan Sederhana: Dalam beberapa dekade terakhir, transfer embrio pada sapi perah telah diterapkan secara luas, dan meningkatkan angka konsepsi setelah transfer embrio telah menjadi tantangan besar dalam reproduksi sapi perah. Progesteron adalah hormon penting selama awal kehamilan pada sapi. Salah satu strategi untuk meningkatkan kadar progesteron dan meningkatkan kesuburan sapi perah adalah dengan menginduksi korpus luteum aksesori melalui pemberian GnRH atau human chorionic gonadotropin setelah transfer embrio. Banyak penelitian mencoba untuk meningkatkan tingkat konsepsi penerima ET, namun gagal memberikan konsensus yang jelas mengenai manfaat terapeutik dari pengobatan tersebut. Oleh karena itu, meta-analisis untuk mengevaluasi kemanjuran hCG dan GnRH dalam meningkatkan angka kehamilan setelah ET dilakukan dalam ulasan ini. Hasil penelitian kami menunjukkan bahwa penggunaan GnRH atau hCG dapat meningkatkan angka kebuntingan pada sapi penerima perah dengan fertilitas sangat buruk (<40%), namun tidak memberikan pengaruh yang signifikan pada sapi dengan fertilitas baik. Dibandingkan dengan analog GnRH atau GnRH, pengobatan hCG memperoleh peningkatan tingkat konsepsi yang lebih baik setelah ET. Pengobatan antara hari ke 5 dan 7 setelah ovulasi tersinkronisasi memberikan manfaat, sedangkan pengobatan setelahnya tidak memberikan hasil. Selain itu, pengobatan lebih efektif pada sapi perah parous laktasi dibandingkan dengan sapi dara. Tinjauan ini mungkin memiliki arti penting dalam pengelolaan kinerja reproduksi di peternakan sapi perah modern.

Abstrak: Sirkulasi konsentrasi progesteron (P4) penerima mempunyai korelasi positif dengan kelangsungan hidup embrio dan keberhasilan kebuntingan transfer embrio (ET) pada sapi perah. Salah satu strategi untuk meningkatkan konsentrasi P4 adalah dengan pemberian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) atau human chorionic gonadotropin (hCG), sehingga menginduksi pembentukan aksesoris corpus luteum (CL). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kemanjuran pengobatan GnRH atau hCG terkait transfer embrio (ET) dan memberikan panduan praktik klinis dokter hewan yang lebih baik. Meta-analisis dilakukan terhadap data 2048 ekor sapi penerima yang diberi perlakuan dan 1.546 ekor sapi yang tidak diberi perlakuan. Dengan menginduksi pembentukan aksesori CL dengan GnRH (100mikrog), analog GnRH Buserelin (8–10mikrog), atau hCG (≥1500 IU) 5–11 hari setelah ovulasi tersinkronisasi, hCG saja mencapai peningkatan (RR = 1,39, P<0,05), sedangkan analog GnRH dan GnRH tidak menghasilkan perubahan yang signifikan (RR = 1,04, P=0,26). Pengobatan dengan GnRH atau hCG 5-7 hari setelah ovulasi tersinkronisasi dikaitkan dengan peningkatan kemungkinan kehamilan dibandingkan dengan pengobatan selanjutnya (11-14 hari). Berkat pengobatan ini, angka kebuntingan pada sapi dengan fertilitas sangat buruk (<40%) dapat ditingkatkan, sedangkan pada sapi dengan fertilitas baik (≥40%) tidak terpengaruh. Pengobatan dengan GnRH atau hCG sangat meningkatkan tingkat kebuntingan sapi menyusui yang parous (RR = 1,32, P<0,05) dibandingkan dengan sapi dara (RR = 1,02, P>0,05). Selain itu, seperti yang ditunjukkan oleh analisis keguguran, pengobatan tidak memberikan manfaat pada kelangsungan hidup embrio akhir/janin awal pada hari ke 28-81. Kesimpulannya, induksi CL aksesori dengan GnRH atau hCG dapat bermanfaat bagi kesuburan dan mempunyai implikasi penting bagi pengelolaan kinerja reproduksi di industri susu.

check for updates

Kutipan: Chen, F.; kamu, Y.; Zhu, X.; Mei, C.; Guo, R.; Shi, Z. Dampak Aksesori Corpus Luteum yang Diinduksi oleh Pelepasan Gonadotropin Hormon atau Human Chorionic Gonadotropin pada Tingkat Kehamilan Sapi Perah setelah Transfer Embrio: Analisis META.*Dokter hewan. Sains.* **2023** ,*10*, 309. https://doi.org/ 10.3390/ vetsci10050309

Editor Akademik: Massimo Faustini

Diterima: 8 Maret 2023
Direvisi: 7 April 2023
Diterima: 17 April 2023
Diterbitkan: 23 April 2023

Hak cipta:© 2023 oleh penulis. Pemegang Lisensi MDPI, Basel, Swiss. Artikel ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan lisensi Creative Commons Attribution (CC BY) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Kata kunci:sapi; kehamilan; transfer embrio; aksesori korpus luteum

1. Perkenalan

Dalam beberapa tahun terakhir, dengan meningkatnya keunggulan genetik dalam produksi susu di seluruh dunia, efisiensi reproduksi sapi perah telah menurun [1,2], dan penurunan selanjutnya sebesar 10% di musim panas karena tekanan panas [3]. Penurunan angka kehamilan mungkin disebabkan oleh kurangnya perkembangan folikel atau oosit, yang sangat sensitif terhadap tekanan lingkungan dan fisiologis [4,5]. Untuk menghindari dampak buruk dari tekanan panas pada perkembangan dan pematangan oosit, ovulasi, dan perkembangan awal embrio, transfer embrio (ET) diadopsi secara luas untuk memfasilitasi kesuburan pada sapi perah sebagai teknologi reproduksi [6–9]. ET, ditambah dengan banyak bioteknik baru, termasuk penyuntingan gen dan kloning inti sel somatik, menjadi alat seleksi genetik.10] dan berkembang biak [11]. Blastokista segar atau yang sudah dicairkan biasanya ditransfer ke penerima sekitar 7 hari setelah perkiraan ovulasi [12]. Meskipun beberapa kelompok gagal menemukan perbedaan tingkat konsepsi antara sapi perah yang melakukan inseminasi buatan tepat waktu (TAI) atau ET, kelompok lain mengamati peningkatan kesuburan dengan ET dibandingkan dengan TAI, karena ET memilih embrio berdasarkan potensi perkembangan dan dapat melewati periode termosensitif yang paling kritis. oosit atau embrio tahap pembelahan awal [13]. Oleh karena itu, dengan menggunakan teknologi ET, tantangan yang disebabkan oleh kegagalan pematangan oosit, kualitas embrio yang buruk, dan rendahnya toleransi terhadap panas dapat diminimalkan, sehingga secara teoritis meningkatkan tingkat kebuntingan penerima ET dibandingkan dengan sapi yang diinseminasi [14].

Kematian embrio dini sebelum implantasi merupakan faktor utama lain yang mengurangi angka kehamilan [15,16]. Hingga 40–60% embrio mati dalam dua minggu pertama setelah pembuahan [17–20], dan hilangnya embrio lebih parah pada sapi dengan hasil tinggi [19,21]. Setelah ET, blastokista berkembang menjadi bulat telur dan kemudian berbentuk tabung setelah menetas dari zona pelusida. Embrio mulai memanjang pada hari ke 12-14, membentuk konseptus berfilamen [16]. Sebagian besar kehilangan ini kemungkinan besar terkait dengan cacat dalam proses pemanjangan konsepsi, di mana embrio mengeluarkan interferon tau untuk mencegah luteolisis.22]. Secara khusus, keberhasilan kehamilan sapi perah memerlukan progesteron yang cukup, sehingga merangsang produksi sekresi endometrium. Sebagaimana ditemukan dalam penelitian, P4 yang disekresikan oleh CL penting selama kehamilan sapi [23]. Kegagalan konsepsi dini dan kematian embrio dapat disebabkan oleh rendahnya sirkulasi P4 antara 5 dan 10 hari setelah ovulasi dan pembuahan.24]. Oleh karena itu, sekresi endometrium kondusif untuk perkembangan dan implantasi embrio [25,26]. Tingkat sirkulasi progesteron yang tidak mencukupi berhubungan dengan perkembangan konsepsi yang tidak menguntungkan [27], dan tidak dapat menahan perkembangan sinyal luteolitik pada sapi perah [28,29]. Selain itu, dibandingkan dengan sapi dara, sapi perah laktasi menunjukkan penurunan kadar P4 plasma, kemungkinan disebabkan oleh peningkatan aliran darah hati dan metabolisme P4 aktif seiring dengan peningkatan produksi susu [30]. Oleh karena itu, peningkatan konsentrasi P4 plasma dapat meningkatkan kesuburan, khususnya pada sapi perah laktasi.

Mengingat konsensus mengenai pentingnya progesteron, terdapat banyak penelitian mengenai suplementasi progesteron pasca inseminasi [31–33]. Strategi umum untuk meningkatkan kadar P4 setelah AI atau ET adalah menginduksi ovulasi dan pembentukan aksesori corpus luteum (CL) dengan gonadotropin-releasing hormone (GnRH), agonis GnRH, atau human chorionic gonadotropin (hCG) ketika folikel dominan (DF) gelombang folikel pertama hadir di ovarium. Aksesori CL yang diinduksi oleh hCG selama diestrus tidak hanya mengubah dinamika folikuler dan luteal, namun juga menunda dan memperpanjang proses luteolitik [34]. Ada beberapa penelitian lain [32,35,36] yang memberikan tinjauan sistemik mengenai dampak suplementasi progesteron (P4) atau pemberian hCG dan GnRH terhadap kesuburan sapi perah setelah inseminasi buatan (AI), yang menunjukkan peningkatan angka kebuntingan secara keseluruhan. Seperti dilansir Yan[35], suplementasi progesteron yang diberikan pada hari ke 3-7 bermanfaat, sedangkan suplementasi progesteron yang diberikan lebih awal atau lebih lambat dari jangka waktu tersebut tidak bermanfaat.

tidak bermanfaat. Yang lain [36] menemukan bahwa pengobatan dengan GnRH 10 hari setelah AI juga kondusif terhadap kehamilan setelah AI. Namun, dampak dari penggunaan CL tambahan dalam program ET belum dianalisis secara sistematis dengan baik.

Banyak penelitian yang mencoba meningkatkan konsentrasi P4 untuk meningkatkan kesuburan sapi ET, namun penelitian ini gagal memberikan konsensus yang jelas mengenai manfaat terapeutik dari pengobatan tersebut. Beberapa melaporkan adanya efek menguntungkan dari GnRH atau hCG pada konsepsi setelah ET, sementara yang lain tidak menunjukkan perbaikan nyata. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kemanjuran hCG dan GnRH dalam peningkatan angka kebuntingan sapi perah pada fase luteal dengan melakukan meta-analisis terhadap data yang tersedia dari semua penelitian tentang pengobatan hCG dan GnRH.

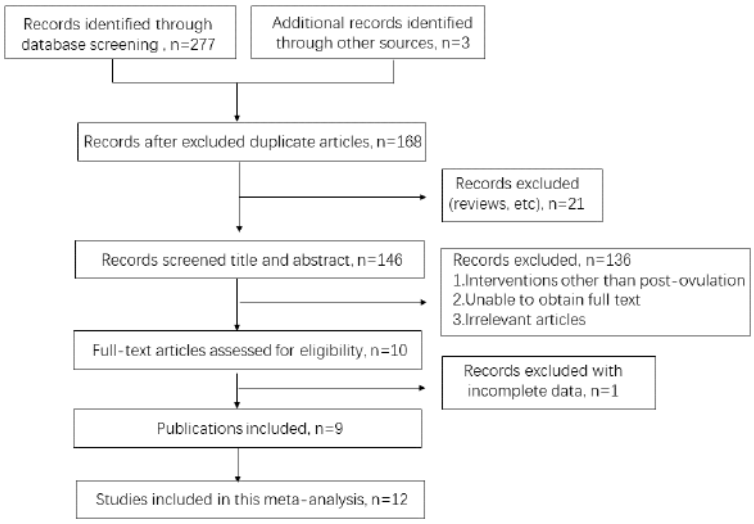
2. Bahan-bahan dan metode-metode

2.1. Kriteria Identifikasi dan Inklusi Studi

Dalam penelitian ini, database PubMed dan Web of Science dipilih untuk mengidentifikasi studi yang memenuhi syarat terhadap penerima pengobatan pasca-ovulasi. Kata kunci yang digunakan dalam pencarian MeSH hanya sebatas "Judul/Abstrak", antara lain (i) transfer embrio atau ET, (ii) sapi perah atau sapi *atau sapi*, (iii) progesteron atau GnRH atau hCG, dan (iv) reproduksi atau kehamilan atau konsepsi. Basis data digeledah oleh dua penyelidik kami secara independen, dan setiap artikel juga ditinjau. Untuk meta-analisis ini, hanya penelitian yang diterbitkan dalam bahasa Inggris yang dimasukkan.

2.2. Kriteria Seleksi Studi

Berdasarkan pedoman Item Pelaporan Pilihan untuk Tinjauan Sistematis dan Meta-Analisis (PRISMA), prinsip PICO (Masalah/Pasien/Populasi, Intervensi, Perbandingan, dan Hasil) perlu diikuti. Kriteria inklusi dicantumkan, termasuk (i) populasi, yaitu sapi perah penerima pada waktu ET; (ii) intervensi yaitu pemberian GnRH atau hCG; (iii) perbandingan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi pengobatan dengan konsentrasi progesteron apa pun; dan (iv) outcome yaitu diagnosis status konsepsi pada hari ke 25 sampai hari ke 100 setelah estrus. Artikel yang berulang dihilangkan, diikuti dengan penyaringan, sehingga memastikan apakah jumlah artikel yang dihasilkan cukup untuk meta-analisis (Gambar1).



Gambar 1. Diagram alir untuk penyaringan literatur.

2.3. Ekstraksi Data dan Ringkasan Hewan Percobaan

Parameter data yang relevan diekstraksi oleh dua peneliti independen (FC dan XZ), dengan perbedaan pendapat diselesaikan melalui diskusi dengan mitra bagian. Terakhir, parameter data di bawah ini diekstraksi, yaitu ID penelitian, penulis pertama, tahun publikasi, wilayah, fitur model hewan (spesies, BCS, dan umur), informasi perlakuan/kontrol (tidak diberi perlakuan)

kelompok (termasuk jenis pengobatan (GnRH/hCG), jumlah hewan, dosis, dan waktu pemberian), dan indikator hasil (termasuk status kebuntingan dan waktu diagnosis).

2.4. Klasifikasi Studi untuk Analisis

Mengingat meta-analisis ini, empat analisis subkelompok dilakukan menurut jenis pengobatan, waktu pengobatan, paritas penerima, dan tingkat kehamilan awal. Dampak pengobatan terhadap tingkat keguguran juga ditentukan.

Mengenai analisis pertama, klasifikasi diterapkan pada penelitian berdasarkan jenis pemberiannya, yaitu GnRH (analog GnRH atau GnRH) atau hCG.

Pada analisis kedua, klasifikasi diterapkan pada waktu pengobatan, yaitu hari ke 5–7 atau hari ke 11–14 siklus estrus, masing-masing sesuai dengan ovulasi folikel dominan (DL) gelombang folikel pertama atau kedua.

Sedangkan pada analisis ketiga, subkelompok dibagi berdasarkan paritasnya, yaitu nullipara atau parous.

Sedangkan pada analisis keempat, klasifikasi diberikan pada penelitian berdasarkan angka kehamilan awal, yaitu buruk (<40%), dan baik (≥40%). Tingkat kehamilan awal didefinisikan sebagai tingkat kehamilan atau tingkat konsepsi dari penerima yang tidak diobati dalam setiap penelitian.

Dalam analisis kelima, hanya penelitian yang melaporkan diagnosis kehamilan sebelum hari ke-35 dan setelah hari ke-42 yang dimasukkan; tingkat keguguran dibandingkan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

2.5. Analisis statistik

RevMan 5.4.1 digunakan dalam meta-analisis. Derajat heterogenitas dievaluasi dengan statistik Cochran Q dan$SAYA^2$statistik proporsi variasi total mengenai heterogenitas. Sebuah nilai $SAYA^2$lebih besar dari 50% dianggap menunjukkan heterogenitas yang lebih tinggi, dengan menerapkan model efek acak. Jika tidak, model efek tetap perlu diadopsi. Identifikasi diberikan pada sumber heterogenitas, dan analisis subkelompok dilakukan. $P<0,05$ dianggap signifikan secara statistik. Rasio risiko (RR) dan interval kepercayaan (CI) 95% dari setiap analisis ditunjukkan dengan membuat plot hutan dan secara grafis. Kotak hitam dan garis horizontal digunakan untuk mewakili setiap penelitian, dan keduanya berhubungan dengan perkiraan titik 95% CI dari setiap penelitian. Kontribusi studi terhadap dampak keseluruhan diwakili oleh ukuran kotak di plot hutan. Pooled RR diperkirakan, dan berlian di bagian bawah plot yang sama digunakan untuk mewakili 95% CI. Pencilan diidentifikasi dengan melakukan diagnosis kasus yang berpengaruh.

Untuk mengetahui kemungkinan interaksi dan bias antara jenis pengobatan, waktu, dosis, dan paritas penerima, uji korelasi dilakukan dengan GraphPad Prism 9.0.0. $P<0,05$ dianggap signifikan secara statistik, yaitu kedua variabel berkorelasi satu sama lain. Tidak ada interaksi atau korelasi signifikan yang terdeteksi antara jenis pengobatan, waktu, dosis, dan paritas penerima (Tambahan Tabel S1).

3. Hasil

3.1. Pemutaran Sastra

Sebanyak 277 studi dengan potensi relevansi diidentifikasi dengan menelusuri PubMed, Science Direct, dan Web of Science. Setelah itu, 122 publikasi berulang dikeluarkan, 136 publikasi dikeluarkan dengan mempertimbangkan kriteria inklusi atau eksklusi, dan satu publikasi dieliminasi karena tidak ada kontrol. Hasilnya, 9 publikasi yang memenuhi syarat dan 12 penelitian independen dimasukkan untuk penelitian ini (ditunjukkan pada Gambar1).

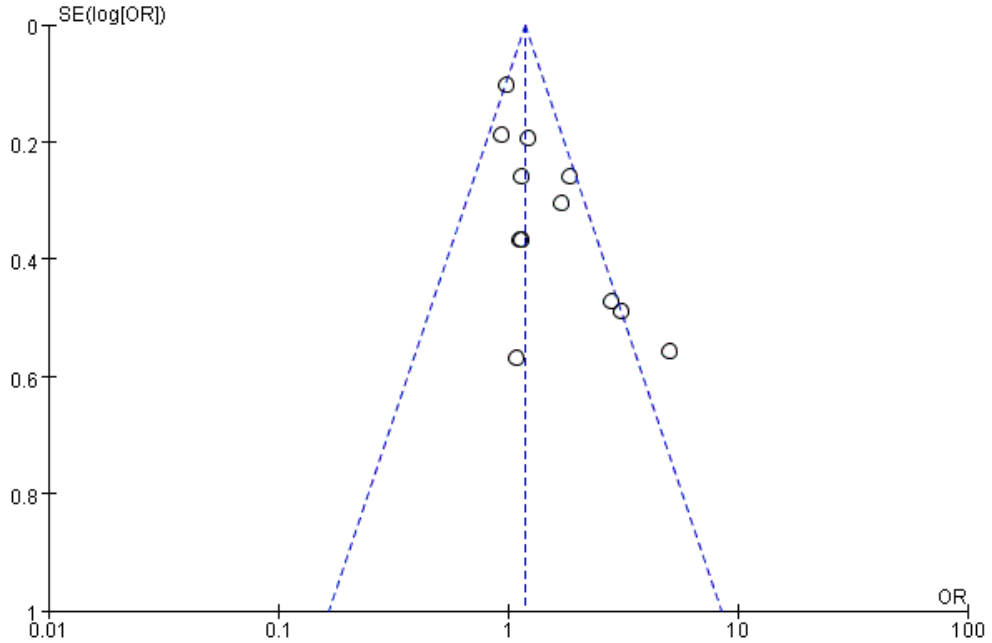
3.2. Karakteristik Studi Termasuk

Ke-12 penelitian yang disertakan menunjukkan perbedaan dalam paritas (multiparitas/primiparitas), jenis pengobatan, dan tingkat kehamilan, dll. Karakteristik umum dari penelitian yang disertakan ditampilkan pada Tabel1. Dalam kaitannya dengan paritas, lima penelitian menggunakan sapi betina menyusui sebagai penerima, enam penelitian menggunakan sapi dara, dan satu penelitian menggunakan sapi primipara dan multipara. Menggunakan pengobatan GnRH dan hCG dalam lima penelitian.

yaitu. Untuk 12 penelitian, kontrol menunjukkan perbedaan besar dalam peluang angka kehamilan, dan perlakuan menunjukkan efek berbeda terhadap angka kehamilan (Gambar2). Plot corong tidak menunjukkan adanya bias dalam publikasi.

Tabel 1. Karakteristik dari sembilan studi termasuk.

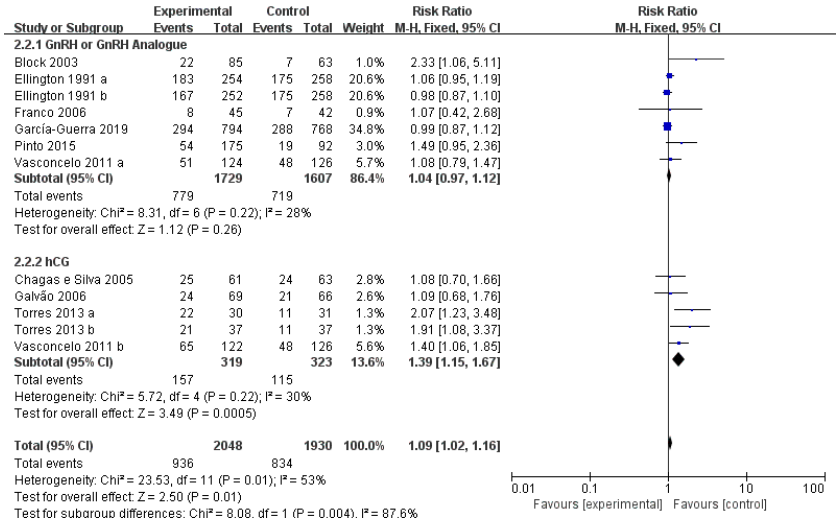
Studi	Berkembang biak dari Penerima	Keseimbangan	Perlakuan Jenis	Dosis	Perlakuan Waktu	Perlakuan (N)	Kontrol (N)	Diagnosa ke-1 (D)	Diagnosa ke-2 (D)
Blokir 2003 [37]	sapi perah	Parous / nulipara	GnRH	100mikroG	11	63	85	53	81
Chagas dan Silva 2005 [38]	sapi perah	nulipara	hCG	1500 IU	7	61	63	28	42
Ellington 1991a [39]	sapi perah	nulipara	GnRH analog Buserelin	8mikroG	7	254	258	35–60	tidak ada
Ellington 1991b [39]	sapi perah	nulipara	GnRH analog Buserelin	8mikroG	11	252	258	35–60	tidak ada
Perancis 2006 [40]	sapi perah	nulipara	GnRH	100mikroG	11	45	42	45–53	tidak ada
GalvAo 2006 [41]	sapi perah	Parous	hCG	3300 IU	5	69	66	28	42
GarcSayaa-Guerra 2019 [42]	sapi perah	nulipara	GnRH	100mikroG	5	794	768	33	60
Pinto 2012 [43]	sapi perah	Parous	GnRH analog	10mikroG Buserelin atau 750mikroG Deslorelin	7	175	92	37	67
Torres 2013a [44]	sapi perah	Parous / nulipara	hCG	1500 IU	7	30	31	28	42/63
Torres 2013b [44]	sapi perah			1500 IU	7	37	37	28	42/63
Vasconcelo 2011a [45]	sapi perah	Parous	GnRH/hCG	100mikroG	7	124	126	28	41
Vasconcelo 2011b [45]	sapi perah			2500 IU	7	122	126	28	41



Gambar 2. Plot corong meta-analisis. Setiap titik mewakili sebuah penelitian. Bentuk plot corong tidak menunjukkan adanya indikasi asimetri plot corong.

3.3. Pengaruh Jenis Perawatan

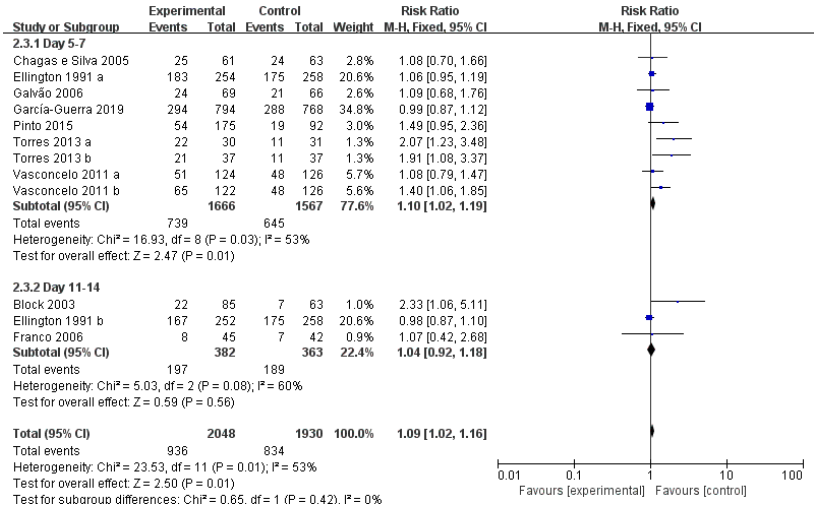
Seperti yang ditunjukkan oleh meta-analisis (Gambar3), kelompok eksperimen menunjukkan peningkatan besar dalam angka kehamilan dengan pemberian hCG atau GnRH 5 hingga 11 hari setelah ovulasi tersinkronisasi (RR = 1,09,P<0,05). Analisis subkelompok selanjutnya dilakukan berdasarkan perlakuan hormon yang berbeda. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar1, angka kebuntingan tidak menunjukkan peningkatan yang nyata ketika merawat sapi dengan 100 ekormikrog GnRH atau analog GnRH (8–10mikrog Buserelin atau 750mikrog Deslorelin) (RR = 1,04,P=0,26). Namun, hal ini menunjukkan peningkatan yang nyata ketika sapi diberi hCG (1500–3300 IU (RR = 1,39,P<0,05).



Gambar 3. Plot hutan: Rasio Rist GnRH dan hCG terhadap tingkat kebuntingan sapi setelah ET. Kotak hitam mengacu pada RR rata-rata untuk peningkatan angka kehamilan berdasarkan administrasi pada setiap penelitian, dengan luas yang sebanding dengan kontribusi penelitian terhadap analisis keseluruhan. Bentuk wajik di bagian bawah menunjukkan kumpulan estimasi RR, dan di sebelah kanan garis vertikal solid mengacu pada dampak positif administrasi terhadap angka kehamilan. RR keseluruhan = 1,09 menunjukkan bahwa pemberian GnRH atau hCG mempunyai dampak yang baik terhadap kesuburan.

3.4. Pengaruh Waktu Perawatan

Mengingat 12 penelitian yang tersedia, 9 penelitian memperlakukan hewan pada ET atau dua hari sebelum ET, menginduksi ovulasi pada folikel dominan (DL) dari gelombang folikel pertama. Tiga penelitian memperlakukan hewan pada hari ke 11, menginduksi ovulasi DL gelombang folikel kedua (Gambar 2).4). Pengobatan pada hari ke 5-7 setelah ovulasi tersinkronisasi menunjukkan peningkatan yang signifikan (RR = 1,10, P<0,05), sedangkan perlakuan pada hari ke 11 melaporkan tidak ada perubahan nyata (RR = 1,04,P=0,56).

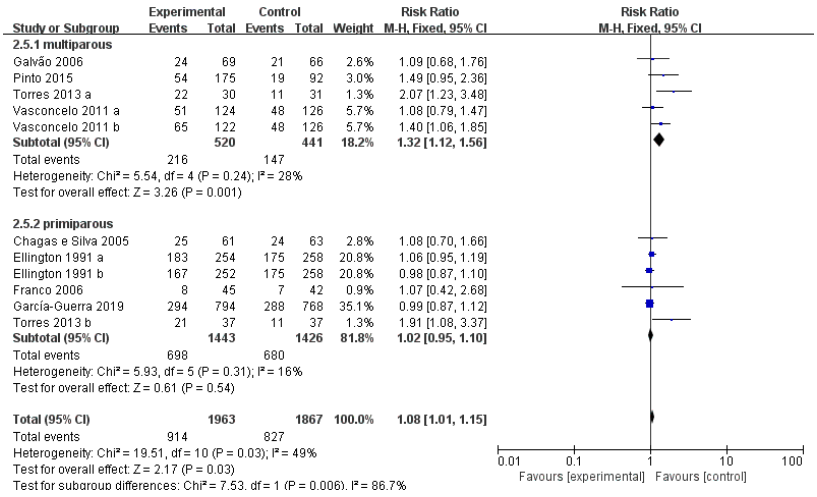


Gambar 4. Plot hutan: Studi rasio risiko yang menyelidiki pengaruh waktu pengobatan terhadap kemanjuran pengobatan GnRH atau hCG terhadap tingkat kebuntingan sapi. Kotak hitam mengacu pada RR rata-rata untuk peningkatan angka kehamilan berdasarkan pelaksanaan setiap penelitian, dengan luas yang sebanding dengan kontribusi penelitian terhadap analisis keseluruhan. Bentuk wajik di bagian bawah menunjukkan kumpulan estimasi RR, dan di sebelah kanan garis vertikal solid mengacu pada dampak positif administrasi terhadap angka kehamilan. Berdasarkan hasil yang diperoleh, pemberian GnRH atau hCG pada hari ke 5–7 memberikan manfaat yang signifikan pada sapi perah.

3.5. Pengaruh Paritas

Dilihat dari 12 penelitian dari sembilan publikasi, 5 penelitian dilakukan dengan mengadopsi sapi dara, 6 penelitian dilakukan dengan menggunakan sapi multipara, dan 1 penelitian tidak memberikan hasil.

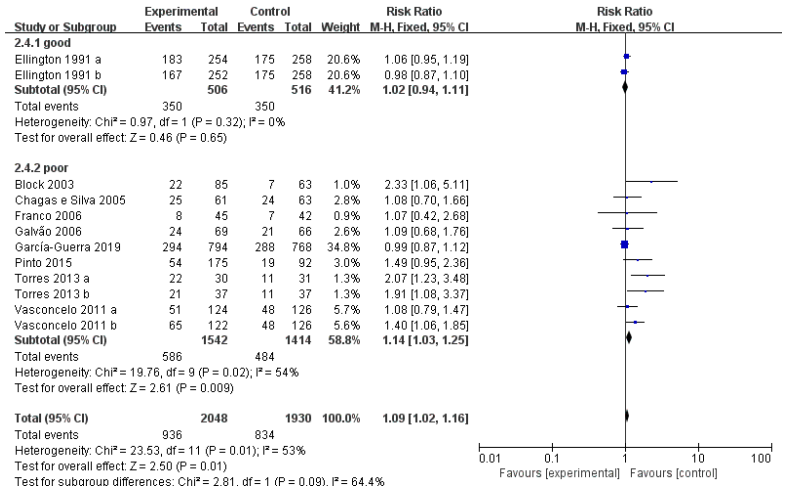
informasi apa pun tentang status paritas. Selain itu, analisis subkelompok dilakukan berdasarkan perbedaan status paritas, yaitu primipara dan multipara. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar5, terdapat perbedaan yang nyata pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol pada multipara sapi (RR = 1,32, *P*<0,05). Tidak ada perbaikan signifikan yang dilaporkan pada sapi dara (*P*=0,59).



F ty pada kemanjuran GnRH atau H usia RR untuk tingkat kehamilan perbaikan dengan administrasi setiap studi, dengan area yang sebanding dengan kontribusi studi terhadap analisis keseluruhan. Bentuk wajik di bagian bawah menunjukkan kumpulan estimasi RR, dan di sebelah kanan garis vertikal solid mengacu pada dampak positif administrasi terhadap angka kehamilan. Berdasarkan hasil penelitian, pemberian GnRH atau hCG memberikan manfaat yang signifikan pada sapi multipara.

3.6. Pengaruh Tingkat Kehamilan Awal

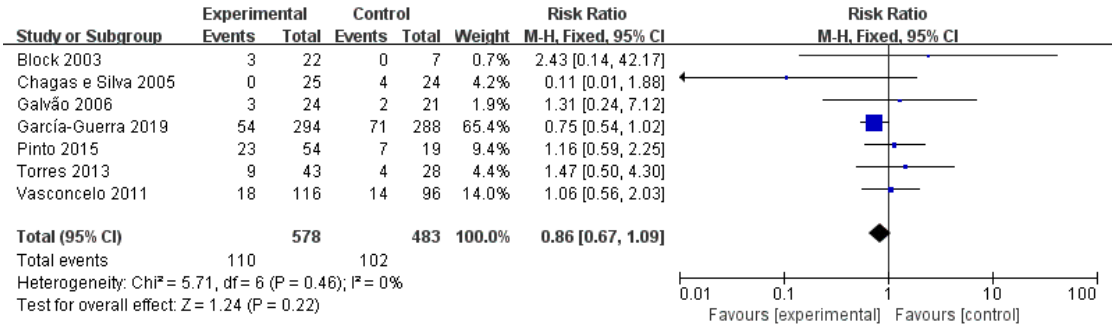
Sebanyak 10 penelitian melaporkan tingkat kehamilan awal yang buruk (Gambar6) (<40%). Metaanalisis menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam tingkat kehamilan penerima yang diobati dengan hCG dan GnRH (RR = 1,14, *P*<0,05). Dua penelitian melaporkan tingkat kehamilan awal yang baik (>40%), dan pengobatan tidak menunjukkan efek positif pada tingkat konsepsi (RR = 1,02, *P*=0,65).



Gambar 6. Plot hutan: Studi rasio risiko yang menyelidiki pengaruh tingkat konsepsi awal terhadap kemanjuran GnRH atau hCG pada tingkat kebuntingan sapi setelah ET. Kotak hitam mengacu pada RR rata-rata untuk peningkatan angka kehamilan berdasarkan pelaksanaan setiap penelitian, dengan luas yang sebanding dengan kontribusi penelitian terhadap analisis keseluruhan. Bentuk wajik di bagian bawah menunjukkan kumpulan estimasi RR, dan di sebelah kanan garis vertikal solid mengacu pada dampak positif administrasi terhadap angka kehamilan. Berdasarkan hasil penelitian, pemberian GnRH atau hCG memberikan manfaat yang signifikan pada sapi dengan tingkat kebuntingan buruk (<40%), namun tidak efektif pada tingkat baik (>40%).

3.7. Kehilangan Kehamilan

Adapun tujuh penelitian yang disertakan, status kebuntingan sapi diperiksa lebih dari satu kali, sehingga mengevaluasi dampak suplementasi P4 terhadap keguguran. Seperti yang ditunjukkan oleh meta-analisis (Gambar7), suplementasi P4 tidak memiliki dampak yang jelas terhadap angka keguguran (RR = 0,86, *P*=0,272).



Gambar 7. Plot hutan: Rasio perbandingan GnRH dan hCG terhadap tingkat keguguran sapi setelah ET. Kotak hitam mengacu pada RR rata-rata untuk peningkatan angka kehamilan berdasarkan administrasi pada setiap penelitian, dengan area yang sebanding dengan kontribusi penelitian terhadap analisis keseluruhan. Seperti yang ditunjukkan oleh hasil, tidak ada dampak pemberian GnRH atau hCG terhadap keguguran (*P*>0,05).

4. Diskusi

Penelitian saat ini menunjukkan bahwa pengobatan hCG lebih meningkatkan tingkat konsepsi dibandingkan dengan GnRH atau analog GnRH. Pengobatan 5-7 hari setelah ovulasi tersinkronisasi dikaitkan dengan peningkatan angka kehamilan dibandingkan dengan pengobatan selanjutnya. Perlakuan tersebut secara signifikan meningkatkan kesuburan sapi dengan kesuburan sangat buruk (<40%), namun tidak berdampak pada sapi dengan kesuburan baik (≥40%). Selain itu, pengobatan ini lebih efektif pada sapi perah laktasi parous dibandingkan sapi dara.

Meskipun beberapa penelitian sebelumnya menemukan hubungan antara pemberian P4 setiap hari dan tingkat kesuburan yang lebih tinggi pada sapi perah [46], ada juga hasil yang berlawanan yang mendukung bahwa suplementasi P4 setelah AI atau ET tidak efektif untuk kesuburan dalam praktiknya [31,32], yang menunjukkan jenis pengobatan, dosis, dan waktu pengobatan dapat memengaruhi kemanjurannya.

Beberapa strategi telah dipublikasikan untuk meningkatkan sirkulasi P4 selama fase luteal awal. Strategi ini mencakup suplementasi P4 selama periode kritis (hari ke 15-19 setelah ovulasi) [47–49] dan pembentukan CL tambahan yang disebabkan oleh pemberian GnRH atau hCG. Menurut penelitian sebelumnya, pembentukan CL tambahan meningkatkan konsentrasi P4 dan mengurangi produksi estrogen [50], secara positif mempengaruhi kelangsungan hidup embrio. Seperti yang ditunjukkan dalam meta-analisis ini, induksi CL aksesori dengan hCG menunjukkan tingkat kehamilan yang lebih tinggi setelah ET dibandingkan pengobatan kontrol. Data ini mendukung dugaan bahwa suplementasi P4 selama implantasi embrio berdampak positif terhadap kesuburan sapi perah.

Selain itu, ovulasi folikel gelombang pertama yang disebabkan oleh GnRH dan hCG dapat mengubah dinamika folikel selama luteolisis [34] dan memberikan lebih banyak waktu bagi embrio untuk memanjang, sehingga menyelamatkan beberapa embrio yang tertunda dan meningkatkan angka kehamilan [35,48]. Seperti yang ditunjukkan oleh analisis subkelompok, pemberian hCG meningkatkan konsistensi, sementara pemberian GnRH mempunyai berbagai efek pada tingkat kehamilan. Dibandingkan dengan GnRH, hCG berikatan dengan reseptor LH sel ovarium secara independen dari kelenjar pituitari [51], dan efeknya lebih tahan lama dibandingkan dengan pelepasan LH endogen [52]. Selain itu, CL yang terbentuk setelah ovulasi yang diinduksi oleh GnRH mungkin tidak berfungsi sepenuhnya [53,54]. Akibatnya, pengobatan hCG biasanya meningkatkan kadar progesteron lebih banyak daripada pengobatan GnRH [55]. Perbedaan penelitian mengenai pengobatan GnRH kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan waktu pengobatan GnRH dan dosis yang disuntikkan.

Khususnya, penelitian sebelumnya menunjukkan adanya perubahan pada angka kebuntingan secara keseluruhan berdasarkan waktu pemberian AI pada sapi. Seperti dilansir Yan[35], suplementasi progesteron pada awal fase luteal, yaitu sebelum hari ketiga setelah inseminasi, tidak memberikan manfaat nyata terhadap angka kehamilan. Hal ini mempunyai mekanisme yang mendasarinya

bahwa pengobatan dini dengan progesteron dapat mendorong perkembangan luteolisis hingga suatu titik waktu untuk respons anti-luteolitik yang memadai yang dapat dihasilkan oleh embrio. Menurut ringkasan Besbaci [36], perlakuan setelah hari ke 10 AI mempunyai hubungan dengan tingginya P/AI jika dibandingkan dengan perlakuan GnRH sebelum hari ke 10 AI. Sebagian besar hewan yang termasuk dalam meta-analisis ini diberikan GnRH atau hCG pada hari ET atau dua hari sebelumnya, 5-7 hari setelah estrus. Hanya dalam tiga penelitian sapi diberikan empat hari setelah ET, dan tidak ada laporan penurunan atau perbaikan nyata dalam angka kebuntingan, bila dibandingkan dengan pengobatan ET. Diindikasikan bahwa induksi CL aksesori selama periode gelombang folikular pertama menghasilkan peningkatan angka kehamilan yang signifikan. Dimungkinkan untuk menciptakan lingkungan rahim yang lebih menguntungkan bagi perkembangan embrio dengan menambahkan progesteron selama fase awal perkembangan embrio, sehingga menyelamatkan beberapa embrio yang tertunda dan meningkatkan kesuburan sapi. Dalam penelitian ini, ketidakefektifan pengobatan GnRH pada hari ke 11 konsisten dengan hasil sebelumnya yang menunjukkan bahwa respons ovulasi terhadap GnRH buruk setelah hari ke 10 siklus karena kurangnya folikel dominan, terutama dari hari ke 10 hingga 14 pada dua hari. gelombang sapi, dan efek penghambatan progesteron tinggi pada induksi lonjakan LH [56].

Mengingat sirkulasi P4 mungkin dibatasi oleh masa laktasi sapi perah, maka dilakukan analisis subkelompok berdasarkan paritas, yaitu sapi dara dan sapi parous. Seperti yang ditunjukkan oleh percobaan ini, pemberian GnRH dan hCG secara signifikan meningkatkan P/ET pada sapi yang melahirkan, menunjukkan kegunaan GnRH dan hCG dalam dukungan luteal sapi menyusui.

Penelitian ini menyelidiki dampak tingkat kebuntingan awal, yaitu tingkat kebuntingan sapi penerima yang tidak diobati, terhadap kemanjuran suplementasi progesteron terhadap tingkat kebuntingan. Berdasarkan temuan, perlakuan dengan GnRH atau hCG dapat meningkatkan P/ET pada sapi dengan fertilitas awal rendah (<40%), namun tidak berpengaruh pada sapi dengan fertilitas tinggi (>40%). Dalam protokol inseminasi buatan waktu tetap, suplementasi P4 meningkatkan P/AI pada sapi perah dengan fertilitas rendah (<45%), namun tidak memberikan manfaat apa pun pada sapi dengan fertilitas awal yang relatif baik [35], sebagaimana dilaporkan. Tingkat kebuntingan pada sapi AI dapat dipengaruhi oleh ovulasi yang tidak teratur, estrus yang tidak tepat, fungsi CL yang tidak mencukupi, dan sirkulasi P4 yang tidak memadai untuk perkembangan embrio. Berbeda dengan sapi AI, sapi penerima di ET menerima embrio yang relatif baik, sehingga menghilangkan potensi dampak negatif terhadap ovulasi atau kualitas oosit. Oleh karena itu, fungsi CL menjadi salah satu tantangan utama terhadap kesuburan dan menimbulkan respons berbeda terhadap CL tambahan pada sapi perah dengan kesuburan awal yang berbeda. Sapi dengan kesuburan awal yang buruk dan CL yang tidak mencukupi menunjukkan respons yang jelas terhadap pengobatan P4. Sebaliknya, sapi dengan kesuburan awal yang baik kemungkinan mempunyai P4 yang cukup. Dengan demikian, efek pengobatan tambahan P4 lebih lanjut pada implantasi embrio cukup minimal.

Berdasarkan meta-analisis ini, jika dibandingkan dengan kontrol, pemberian GnRH dan hCG tidak memiliki pengaruh nyata terhadap angka keguguran. Sebagian besar kehilangan embrio terjadi pada 16 hari pertama pada sapi perah, dan sekitar 5,8% kehilangan kebuntingan terjadi pada hari ke 32-100 [10] pada sapi potong. Mengingat uji coba yang mencakup status kehamilan yang didiagnosis dua kali, tingkat keguguran secara keseluruhan adalah 7,3% pada kelompok kontrol dan 7,4% pada kelompok perlakuan. Hasil ini memberikan bukti kuat bahwa kelangsungan hidup embrio pada bulan pertama setelah estrus sangat penting untuk meningkatkan angka kehamilan dan manfaat ekonomi.

Khususnya, meta-analisis saat ini dilakukan dengan mengadopsi penelitian dengan GnRH atau hCG yang diberikan pada sapi, untuk mengeksplorasi apakah pemberian CL tambahan dapat menghasilkan peningkatan konsensus dalam tingkat kebuntingan. Selain pemberian GnRH atau hCG, penggunaan equine chorionic gonadotropin (eCG) dalam protokol sinkronisasi, protokol berbasis estradiol/progestin, dan protokol berbasis GnRH adalah strategi paling umum untuk meningkatkan angka kehamilan pada transfer embrio waktu tetap (FTET) [57]. Banyak penelitian [58,59] menunjukkan bahwa pemberian eCG dalam protokol sinkronisasi FTET mengakibatkan peningkatan angka kehamilan, terutama pada penerima yang dikelola dalam kondisi yang tidak optimal. Namun, sebagian besar penelitian menggunakan eCG pada periode sinkronisasi, bukan pada fase luteal awal. Hanya satu penelitian yang menggunakan eCG untuk memperkenalkan aksesori CL, tetapi pada sapi potong [60]. Sedangkan untuk pengobatan selama fase luteal awal, empat penelitian yang ada mengadopsi pelepasan obat internal terkontrol (CIDR) setelah ovulasi, sehingga meningkatkan konsentrasi P4 dan

angka kehamilan. Oleh karena itu, tiga penelitian [47,61,62] merawat sapi potong atau sapi perah dengan CIDR yang mengandung 1,9 g P4 selama 12-13 hari, dan semuanya tidak dirancang dengan kekuatan statistik yang cukup untuk mendeteksi perbedaan kebuntingan antara kelompok kontrol dan CIDR (28,6 vs. 41,1%, 15,5 vs. 25,0%, dan 67 vs. 73%, masing-masing). Menurut penelitian lain [63], angka kehamilan dapat dikurangi dengan memasukkan CIDR 4 hari sebelum ET (39,7 vs. 21,3% vs. 15,2%, masing-masing untuk ET-Control, ET-CIDR-4, dan ET-CIDR-14). Temuan ini serupa dengan kesimpulan meta-analisis Yan, yang menyimpulkan bahwa pelaporan pengobatan lebih awal dari tiga hari setelah AI tidak berkorelasi dengan kemungkinan terjadinya pembuahan per AI.

Meskipun demikian, penelitian yang ada menawarkan data yang cukup untuk analisis moderator mengenai jenis dan waktu pengobatan, paritas, dan kesuburan awal. Faktor-faktor lain mungkin mempengaruhi tingkat kehamilan, termasuk musim [64], status gizi [65], BCS [65], dan status embrio yang ditransfer (diproduksi in vitro atau in vivo, segar atau dicairkan). Misalnya, jenis embrio (segar/cair/semi) dan suhu (normal/tertekan panas) dapat mengganggu kesuburan awal kontrol. Namun, catatan yang ada tidak cukup untuk diperiksa berdasarkan penelitian sebelumnya. Kondisi iklim dan pengelolaan juga dapat berdampak pada kesuburan penerima, namun kami tidak dapat melakukan analisis subkelompok lain berdasarkan catatan yang tidak memadai mengenai iklim atau musim. Sebuah studi lebih lanjut berdasarkan lima studi sapi perah yang mengalami tekanan panas menunjukkan bahwa GnRH/hCG meningkatkan tingkat konsepsi pada suhu yang cukup tinggi (Gambar Tambahan S1). Strategi pengelolaan reproduksi terbaik bergantung pada berbagai faktor. Dengan melakukan penelitian lebih lanjut, akan dimungkinkan untuk membandingkan pengaruh moderator di atas terhadap kinerja reproduksi secara keseluruhan, sehingga dapat mengarahkan penerapannya di lapangan.

5. Kesimpulan

Meta-analisis ini menguji hubungan antara pembentukan CL tambahan di sekitar ET dan hasil ET pada sapi perah. Induksi CL aksesori dengan hCG dapat meningkatkan angka konsepsi sapi perah penerima, sedangkan analog GnRH dan GnRH tidak memberikan perubahan yang signifikan. Hasilnya jelas menunjukkan bahwa pemberian hCG atau GnRH 5-7 hari setelah sinkronisasi ovulasi dikaitkan dengan peningkatan angka kehamilan, dibandingkan dengan pengobatan selanjutnya. Induksi CL aksesori dengan GnRH atau hCG sangat meningkatkan performa reproduksi sapi penerima dengan kesuburan rendah. Tidak ada perbedaan yang diamati dalam terjadinya keguguran antara sapi yang diberi GnRH dan hCG dan kontrol. Meta-analisis ini menunjukkan manfaat menginduksi CL tambahan dengan hCG atau GnRH pada sapi penerima ET, dan menyoroti pentingnya jenis pengobatan, waktu, paritas, dan kesuburan awal dalam mencapai tingkat kebuntingan yang lebih tinggi.

Bahan Tambahan: Informasi pendukung berikut dapat diunduh di:https://www. mdpi.com/article/10.3390/vetsci10050309/s1, Gambar S1: Pengobatan dengan hCG atau GnRH terhadap tingkat kebuntingan sapi perah yang mengalami stres panas.; Tabel S1: Uji interaksi.

Kontribusi Penulis:FC, YH dan CM menyusun dan merancang penelitian ini. FC dan XZ memberikan tinjauan sistematis terhadap literatur, mengekstraksi data, dan menyusun naskah. RG dan ZS mengawasi penelitian ini. Semua penulis telah membaca dan menyetujui versi naskah yang diterbitkan.

Pendanaan: Pekerjaan ini didanai oleh National Natural Science Foundation (NSFC) Tiongkok (1802066), Natural Science Foundation of Jiangsu (BK20190256), Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No. cstc2020jcyj-msxmX0369), dan Inner Mongolia Municipality Science dan Program Teknologi (2021GG0402).

Pernyataan Dewan Peninjau Kelembagaan: Tak dapat diterapkan.

Pernyataan Persetujuan yang Diinformasikan: Tak dapat diterapkan.

Pernyataan Ketersediaan Data: Penulis koresponden dapat memberikan data yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan permintaan.

Ucapan Terima Kasih: Kami mengakui dan menghargai informasi yang diberikan oleh penulis referensi untuk penelitian ini.

Konflik Kepentingan: Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

Referensi

1. Lucy, MC Hilangnya reproduksi pada sapi perah berproduksi tinggi: Di mana hal ini akan berakhir?*J. Ilmu Susu.***2001**,*84*, 1277–1293. [Referensi Silang] [PubMed]
2. Butler, WR Interaksi nutrisi dengan performa reproduksi pada sapi perah.*animasi. mereproduksi. Sains.***2000**,*60–61*, 449–457. [Referensi Silang] [PubMed]
3. Ahmed, A.; Tiwari, RP; Mishra, GK; Jena, B.; Dar, MA; Bhat, AA Pengaruh tekanan panas lingkungan terhadap kinerja reproduksi sapi perah—Sebuah tinjauan.*Int. J. Hidup. Res.***2015**,*5*, 10–18. [Referensi Silang]
4. Roth, Z. Stres panas, folikel, dan oosit tertutupnya: Mekanisme dan strategi potensial untuk meningkatkan kesuburan pada sapi perah. *mereproduksi. Domestik. animasi.***2008**,*43*, 238–244. [Referensi Silang] [PubMed]
5. Payton, RR; Rispoli, LA; Saxon, AM; Edwards, JL Dampak paparan tekanan panas selama pematangan meiosis pada oosit, sel kumulus di sekitarnya, dan populasi RNA embrio.*J.Reproduksi. Dev.***2011**,*57*, 471–481. [Referensi Silang]
6. Baruselli, PS; Ferreira, RM; Vieira, LM; Souza, AH; Bo, GA; Rodrigues, CA Penggunaan transfer embrio untuk mengurangi infertilitas yang disebabkan oleh tekanan panas.*Teriogenologi***2020**,*155*, 1–11. [Referensi Silang]
7. Ferreira, RM; Ayres, H.; Chiaratti, BAPAK; Ferraz, ML; Araujo, AB; Rodrigues, California; Watanabe, YF; Vireque, AA; Joaquim, DC; Smith, LC; dkk. Rendahnya kesuburan sapi peternak berulang selama stres panas musim panas berhubungan dengan rendahnya kompetensi oosit untuk berkembang menjadi blastokista.*J. Ilmu Susu.***2011**,*94*, 2383–2392. [Referensi Silang]
8. Ferreira, RM; Chiaratti, BAPAK; Macabelli, CH; Rodrigues, California; Ferraz, ML; Watanabe, YF; Smith, LC; Meirelles, FV; Baruselli, PS Infertilitas sapi yang dipelihara berulang kali selama musim panas dikaitkan dengan penurunan DNA mitokondria dan peningkatan ekspresi gen mitokondria dan apoptosis pada oosit.*biologi. mereproduksi.***2016**,*94*, 133017.[Referensi Silang]
9. Roth, Z. Ulasan simposium: Penurunan kompetensi perkembangan oosit akibat stres dikaitkan dengan perubahan fungsi mitokondria.*J. Ilmu Susu.***2018**,*101*, 3642–3654. [Referensi Silang]
10. Bortoletto, P.; Bakkensen, J.; Anchan, RM Transfer embrio: Waktu dan teknik.*Minerva Endokrinol.***2018**,*43*, 57–68. [Referensi Silang]
11. Dochi, O.; Takahashi, K.; Hirai, T.; Hayakawa, H.; Tanisawa, M.; Yamamoto, Y.; Koyama, H. Penggunaan transfer embrio untuk menghasilkan kehamilan pada sapi perah yang dikawinkan berulang.*Teriogenologi***2008**,*69*, 124–128. [Referensi Silang] [PubMed]
12. Baruselli, PS; Ferreira, RM; Penjualan, JN; Gimenes, LU; Sa Filho, MF; Martins, CM; Rodrigues, California; Bo, GA Program transfer embrio berjangka waktu untuk pengelolaan sapi donor dan penerima.*Teriogenologi***2011**,*76*, 1583–1593. [Referensi Silang] [PubMed]
13. Nowicki, A. Transfer embrio sebagai salah satu pilihan untuk meningkatkan kesuburan pada sapi perah yang berulang kali diternak.*J.Dokter Hewan. Res.***2021**,*65*, 231–237. [Referensi Silang]
14. Hasler, JF Status saat ini dan masa depan transfer embrio komersial pada sapi.*animasi. mereproduksi. Sains.***2003**,*79*, 245–264. [Referensi Silang]
15. Diskin, MG; Murphy, JJ; Sreenan, JM Kelangsungan hidup embrio pada sapi perah dikelola dalam kondisi pastoral.*animasi. mereproduksi. Sains.* **2006**,*96*, 297–311. [Referensi Silang]
16. Penyendiri, P.; SAnchez, JM; Mathew, DJ; Passaro, C.; Adil, T. Perkembangan embrio pada sapi dan interaksinya dengan saluran reproduksi. *mereproduksi. Subur. Dev.***2018**,*31*, 118–125. [Referensi Silang] [PubMed]
17. Dunne, LD; Diskin, MG; Sreenan, JM Hilangnya embrio dan janin pada sapi dara antara hari ke 14 kebuntingan hingga cukup bulan.*animasi. mereproduksi. Sains.***2000**,*58*, 39–44. [Referensi Silang] [PubMed]
18. Ryan, DP; Prichard, JF; Kopel, E.; Godke, RA Membandingkan kematian embrio dini pada sapi perah selama musim panas dan dingin dalam setahun.*Teriogenologi***1993**,*39*, 719–737. [Referensi Silang]
19. Reese, ST; Perancis, GA; Poole, RK; Kap, R.; Fernadez Montero, L.; Oliveira Filho, RV; Masak, RF; Pohler, KG Kehilangan kebuntingan pada sapi potong: Sebuah meta-analisis.*animasi. mereproduksi. Sains.***2020**,*212*, 106251.[Referensi Silang]
20. Wiltbank, MC; Baez, GM; Garcia-Guerra, A.; Toledo, MZ; Monteiro, PL; Melo, LF; Ochoa, JC; Santos, JE; Sartori, R. Periode penting keguguran pada trimester pertama kehamilan pada sapi perah menyusui.*Teriogenologi***2016**,*86*, 239–253. [Referensi Silang]
21. Sartori, R.; Bastos, Bpk; Wiltbank, MC Faktor yang mempengaruhi fertilisasi dan kualitas embrio awal pada sapi perah tunggal dan superovulasi. *mereproduksi. Subur. Dev.***2010**,*22*, 151–158. [Referensi Silang] [PubMed]
22. Mathew, DJ; Peterson, KD; Senn, LK; Oliver, MA; Ealy, AD Interaksi konseptus-ibu ruminansia: Interferon-tau dan seterusnya. *J.Anim. Sains.***2022**,*100*, skac123. [Referensi Silang]
23. Penyendiri, P.; Ford, N.; Spencer, T. Peran progesteron dalam perkembangan embrio pada sapi.*mereproduksi. Subur. Dev.***2016**,*28*, 66–74. [Referensi Silang]
24. Nanas, I.; Chouzouris, TM; Dovolou, E.; Dadouli, K.; Stamperna, K.; Kateri, saya.; Barbagianni, M.; Amiridis, GS Kehilangan embrio dini, kadar glikoprotein terkait progesteron dan kehamilan selama stres panas musim panas pada sapi perah.*J. Term. biologi.***2021**, *98*, 102951.[Referensi Silang]
25. Geisert, RD; Morgan, GL; Pendek, EC, Jr.; Zavy, MT Peristiwa endokrin berhubungan dengan fungsi endometrium dan perkembangan konsepsi pada sapi.*mereproduksi. Subur. Dev.***1992**,*4*, 301–305. [Referensi Silang]
26. Graham, JD; Clarke, CL Tindakan fisiologis progesteron pada jaringan target.*Endokr. Putaran.***1997**,*18*, 502–519. [Referensi Silang]
27. Lonergan, P. Pengaruh Progesteron Terhadap Kualitas oosit dan Perkembangan Embrio pada Sapi.*Teriogenologi***2011**,*76*, 1594–1601. [Referensi Silang] [PubMed]
28. Mann, GE; Lamming, GE Progesteron menghambat perkembangan sinyal luteolitik pada sapi.*J.Reproduksi. Subur.***1995**,*104*, 1–5. [Referensi Silang] [PubMed]

29.Hansen, TR; Sinedino, LDP; Spencer, TE Tindakan parakrin dan endokrin interferon Tau (Ifnt).*Reproduksi***2017**,*154*, F45–F59. [Referensi Silang] [PubMed]

30. Wiltbank, M.; Lopez, H.; Sartori, R.; Sangsritavong, S.; Gumen, A. Perubahan fisiologi reproduksi sapi perah laktasi akibat peningkatan metabolisme steroid.*Teriogenologi***2006**,*65*, 17–29. [Referensi Silang]

31. Mendonca, LGD; Mantelo, FM; Stevenson, JS Kesuburan sapi perah menyusui yang diobati dengan hormon pelepas gonadotropin pada ai, 5 hari setelah ai, atau keduanya, selama stres panas musim panas.*Teriogenologi***2017**,*91*, 9–16. [Referensi Silang] [PubMed]

32. Nascimento, AB; Bender, RW; Souza, AH; Ayres, H.; Araujo, RR; Guenther, JN; Sartori, R.; Wiltbank, MC Pengaruh pengobatan dengan human chorionic gonadotropin pada hari ke 5 setelah inseminasi buatan terhadap kesuburan sapi perah laktasi.*J. Ilmu Susu.* **2013**,*96*, 2873–2882. [Referensi Silang] [PubMed]

33. Cunha, UNTUK; Martinez, W.; Walleser, E.; Martins, JPN Pengaruh pemberian gnrh dan hCG pada fase luteal awal terhadap panjang siklus estrus, ekspresi estrus dan kesuburan pada sapi perah laktasi.*Teriogenologi***2021**,*173*, 23–31. [Referensi Silang]

34. Cunha, UNTUK; Statz, LR; Domingue, RR; Andrade, JPN; Wiltbank, MC; Martins, JPN Aksesori corpus luteum yang diinduksi oleh human chorionic gonadotropin pada hari ke 7 atau hari ke 7 dan 13 siklus estrus mempengaruhi dinamika folikular dan luteal serta luteolisis pada sapi holstein menyusui.*J. Ilmu Susu.***2022**,*105*, 2631–2650. [Referensi Silang] [PubMed]

35. Yan, L.; Robinson, RS; Shi, Z.; Mann, GE Khasiat suplementasi progesteron selama awal kehamilan pada sapi: Sebuah meta-analisis.*Teriogenologi***2016**,*85*, 1390–1398.e1. [Referensi Silang]

36. Besbaci, M.; Abdelli, A.; Minviel, JJ; Belabdi, I.; Kaidi, R.; Raboisson, D. Asosiasi kehamilan per inseminasi buatan dengan hormon pelepas gonadotropin dan human chorionic gonadotropin yang diberikan selama fase luteal setelah inseminasi buatan pada sapi perah: Sebuah meta-analisis.*J. Ilmu Susu.***2020**,*103*, 2006–2018. [Referensi Silang]

37. Blok, J.; Sampah, M.; Musim, RL; Rutledge, JJ; Rivera, RM; Paula-Lopes, FF; Okon, OM; Krininger, CE; Liu, J.; Hansen, PJ Penggunaan faktor pertumbuhan mirip insulin-i selama kultur embrio dan pengobatan penerima dengan hormon pelepas gonadotropin untuk meningkatkan angka kehamilan setelah transfer embrio yang diproduksi secara in vitro ke sapi yang mengalami stres panas dan menyusui.*J.Anim. Sains.***2003**, *81*, 1590–1602. [Referensi Silang]

38. Chagas E Silva, J.; Lopes Da Costa, L. Pengaruh luteotrofik embrio sapi awal dan hubungan antara konsentrasi progesteron plasma dan kelangsungan hidup embrio.*Teriogenologi***2005**,*64*, 49–60. [Referensi Silang]

39. Ellington, JE; Kaki, RH; Farrell, PB; Hasler, JF; Webb, J.; Henderson, Bank Dunia; McGrath, AB Tingkat kehamilan setelah penggunaan agonis hormon pelepas gonadotropin pada penerima transfer embrio sapi.*Teriogenologi***1991**,*36*, 1035–1042. [Referensi Silang]

40. Franco, M.; Blokir, J.; Jousan, FD; e Paula, LAdC; Brad, SAYA; Franco, JM; Grisel, F.; Musim, RL; Rutledge, JJ; Hansen, PJ Pengaruh transfer satu atau dua embrio yang diproduksi secara in vitro dan pemberian hormon pelepas gonadotropin pasca transfer terhadap tingkat kebuntingan sapi perah yang mengalami stres panas.*Teriogenologi***2006**,*66*, 224–233. [Referensi Silang]

41. GalvAo, buku; Santos, JE; Coscioni, AC; Juchem, JADI; Chebel, RC; Sischo, WM; Villaseñor, M. Kelangsungan hidup embrio dari sapi dara yang diberi makan gossypol setelah dipindahkan ke sapi menyusui yang diobati dengan human chorionic gonadotropin.*J. Ilmu Susu.***2006**,*89*, 2056–2064. [Referensi Silang] [PubMed]

42. GarcSayaa-Guerra, A.; Sala, RV; Carrenho-Sala, L.; Baez, GM; Motta, JCL; Fosado, M.; Moreno, JF; Wiltbank, MC Perawatan pascaovulasi dengan gnrh pada hari ke 5 mengurangi keguguran pada penerima yang menerima blastokista yang diperluas secara in vitro. *Teriogenologi***2020**,*141*, 202–210. [Referensi Silang] [PubMed]

43. Pinto, TLC; Nogueira, MBR; Penjualan, JNDS; Carvalho, RRD; Cushman, RA; Souza, JCD Faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat kehamilan setelah pengambilan sel telur dari transfer embrio pada penerima holstein menyusui dalam kondisi tropis.*Ciência Agroteknologia***2015**, *39*, 498–505. [Referensi Silang]

44. Torres, A.; Chagas E Silva, J.; Deloche, MC; Rendah hati, P.; Horta, AE; Lopes-Da-Costa, L. Corpora lutea sekunder yang diinduksi oleh pengobatan hCG meningkatkan kelangsungan hidup demi-embrio pada sapi perah dengan hasil tinggi dan menyusui.*mereproduksi. Domestik. animasi. Zuchthyg.***2013**,*48*, 643–650. [Referensi Silang]

45. Vasconcelos, JL; Dan, SF; Justolin, PL; Morelli, P.; Aragon, Florida; Veras, MB; Soriano, S. Pengaruh pengobatan gonadotropin pasca kawin terhadap tingkat konsepsi sapi perah laktasi yang mengalami inseminasi buatan atau transfer embrio tepat waktu di lingkungan tropis.*J. Ilmu Susu.***2011**,*94*, 223–234. [Referensi Silang]

46.Mann, GE; Lamming, GE; Robinson, RS; Wathes, DC Regulasi produksi interferon-tau dan reseptor hormon uterus selama awal kehamilan.*J.Reproduksi. Subur. Suplai.***1999**,*54*, 317.

47. Marques, MO; Nasser, LF; Silva, R.; BHai,G.; Penjualan, J.; Filho, MFS; Reis, EL; Binelli, M.; Baruselli, PS Dinamika folikel dan tingkat kehamilan pada penerima transfer embrio bos taurus x bos indicus diobati untuk meningkatkan konsentrasi progesteron plasma. *animasi. mereproduksi.***2012**, *9*, 118–119.

48. Binelli, M.; Thatcher, WW; Mattos, R.; Baruselli, PS strategi antiluteolitik untuk meningkatkan kesuburan sapi.*Teriogenologi***2001**,*56*, 1451–1463. [Referensi Silang]

49. Thatcher, WW; Moreira, F.; Pancarci, SM; Bartolome, JA; Santos, JEP Strategi untuk mengoptimalkan efisiensi reproduksi dengan mengatur fungsi ovarium.*Domestik. animasi. Endokrinol.***2002**,*23*, 243–254. [Referensi Silang]

50. Araujo, RR; Ginther, OJ; Ferreira, JC; Palhao, MM; Mohon, MA; Wiltbank, MC Peran estradiol-17beta folikular dalam waktu luteolisis pada sapi dara. *biologi. mereproduksi.***2009**,*81*, 426–437. [Referensi Silang]

51. De Rensis, F.; Lopez-Gatius, F.; Garcia-Ispierto, I.; Techakumpu, M. Penggunaan klinis human chorionic gonadotropin pada sapi perah: Pembaruan.*Teriogenologi***2010**,*73*, 1001–1008. [Referensi Silang]

52. Schmitt, EJ; Barros, CM; Bidang, PA; Bidang, MJ; Diaz, T.; Kluge, JM; Thatcher, WW A Karakterisasi seluler dan endokrin dari korpus luteum asli dan terinduksi setelah pemberian agonis hormon pelepas gonadotropin atau human chorionic gonadotropin pada hari kelima siklus estrus.*J.Anim. Sains.***1996**,*74*, 1915–1929. [Referensi Silang]
53. Santos, JE; Thatcher, WW; Kolam renang, L.; Overton, MW Pengaruh human chorionic gonadotropin pada fungsi luteal dan kinerja reproduksi sapi perah holstein laktasi berproduksi tinggi.*J.Anim. Sains.***2001**,*79*, 2881–2894. [Referensi Silang]
54. Schmitt, EJ; Diaz, T.; Sampah, M.; Thatcher, WW Penggunaan agonis hormon pelepas gonadotropin atau human chorionic gonadotropin untuk inseminasi waktunya pada sapi.*J.Anim. Sains.***1996**,*74*, 1084–1091. [Referensi Silang]
55. Cabrera, EM; Lauber, BAPAK; Peralta, EM; Bilby, TR; Fricke, PM Respon dosis human chorionic gonadotropin untuk induksi ovulasi 7 hari setelah ovulasi tersinkronisasi pada sapi holstein menyusui.*Jds Komuni.***2021**,*2*, 35–40. [Referensi Silang] [PubMed]
56. Giordano, JO; Frike, PM; Guenther, JN; Lopes, G., Jr.; Herlihy, MM; Nascimento, AB; Wiltbank, MC Pengaruh progesteron terhadap besarnya lonjakan hormon luteinisasi yang disebabkan oleh dua dosis hormon pelepas gonadotropin yang berbeda pada sapi perah menyusui.*J. Ilmu Susu.***2012**,*95*, 3781–3793. [Referensi Silang] [PubMed]
57.BHai,tidak; Peres, LC; Cutaia, LE; Pincinato, D.; Baruselli, PS; Mapletoft, RJ Perawatan untuk sinkronisasi penerima sapi untuk transfer embrio waktu tetap dan peningkatan angka kehamilan.*mereproduksi. Subur. Dev.***2011**,*24*, 272–277. [Referensi Silang]
58. Baruselli, PS; Ferreira, RM; Mf, SF; Nasser, LF; Rodrigues, California; BHai,Sinkronisasi dan pengelolaan penerima transfer embrio GA Bovine di lingkungan tropis.*mereproduksi. Subur. Dev.***2010**,*22*, 67–74. [Referensi Silang]
59.BHai,tidak; Baruselli, PS; Moreno, D.; Cutaia, L.; Caccia, M.; TrSayabulo, R.; TrSayabulo, H.; Mapletoft, RJ Pengendalian perkembangan gelombang folikuler untuk program transfer embrio yang ditunjuk sendiri pada sapi.*Teriogenologi***2002**,*57*, 53–72. [Referensi Silang]
60. O'hara, L.; Ford, N.; Duffy, P.; Randi, F.; Kelly, AK; Valenza, A.; Rodriguez, P.; Lonergan, P. Pengaruh kombinasi progesteron eksogen dengan dukungan luteotrofik melalui equine chorionic gonadotrophin (ecg) pada perkembangan korpus luteum, konsentrasi progesteron yang bersirkulasi, dan perkembangan embrio pada sapi.*mereproduksi. Subur. Dev.***2016**,*28*, 269–277. [Referensi Silang] [PubMed]
61. Steichen, MM; Larson, JE Pengaruh suplementasi progesteron menggunakan sisipan cidr pada kebuntingan per transfer embrio sapi perah penerima embrio yang diproduksi secara in vitro.*animasi. mereproduksi. Sains.***2019**,*203*, 45–51. [Referensi Silang]
62. Chagas E Silva, J.; Diniz, P.; Lopes Da Costa, L. Efek luteotrofik, pertumbuhan dan kelangsungan hidup embrio utuh versus setengah dan, hubungannya dengan konsentrasi progesteron plasma sapi perah penerima.*animasi. mereproduksi. Sains.***2008**,*104*, 18–27. [Referensi Silang]
63. Monteiro, PL, Jr.; Nascimento, AB; Pontes, GC; Fernandes, PERGI; Melo, LF; Wiltbank, MC; Sartori, R. Suplementasi progesteron setelah ovulasi: Efek pada fungsi korpus luteum dan kesuburan sapi perah yang diberi Ai Or Et. *Teriogenologi***2015**,*84*, 1215–1224. [Referensi Silang] [PubMed]
64. Mastromonaco, GF; Gonzalez-Grajales, AL Reproduksi sapi liar betina: Pengaruh musim terhadap seni.*Teriogenologi* **2020**,*150*, 396–404. [Referensi Silang] [PubMed]
65. Font, PLP; Oosthuizen, N.; Ciriaco, FM; Sanford, CD; Kanal, LB; Masak, RF; Pohler, KG; Henry, DD; Mercadante, VRG; Awal, IKLAN; dkk. Pengaruh pembatasan nutrisi terhadap profil metabolisme dipengaruhi oleh bos indicus dan b. taurus menyusu sapi potong. *animasi. Int. J.Anim. biosci.***2021**,*15*, 100166.[Referensi Silang] [PubMed]

Penafian/Catatan Penerbit: Pernyataan, pendapat dan data yang terkandung dalam semua publikasi adalah sepenuhnya milik masing-masing penulis dan kontributor dan bukan milik MDPI dan/atau editor. MDPI dan/atau editor melepaskan tanggung jawab atas kerugian apa pun pada orang atau properti akibat ide, metode, instruksi, atau produk apa pun yang dirujuk dalam konten.

scientific reports

Check for updates

MEMBUKA

Dampak sulitnya transfer embrio terhadap keberhasilannya IVF: tinjauan sistematis dan meta-analisis

Giulia Galati[1*], Marco Reschini[2], Laura Mensi[2], Camilla Di Dio[1], Edgardo Somigliana[2,3] & Ludovico Muzii[1]

Prosedur transfer embrio (ET) harus dilakukan selembut mungkin karena trauma apa pun dapat menyebabkan kontraktilitas uterus yang mengganggu implantasi. Namun, perilaku ideal ini tidak selalu memungkinkan, dan tindakan tambahan mungkin diperlukan (ET yang sulit). Berbagai penelitian telah mengevaluasi dampak kesulitan ET terhadap angka kehamilan klinis (CPR), namun hasilnya tidak seragam. Tinjauan sistematis dan meta-analisis ini bertujuan untuk memberikan perkiraan yang tepat mengenai kemungkinan efek merugikan dari kesulitan ET pada CPR. Protokol penelitian telah didaftarkan secara online (nomor PROSPERO: CRD42023387197). Pencarian database elektronik dilakukan untuk mengidentifikasi artikel yang diterbitkan hingga September 2022. Hasil utamanya adalah CPR. Lima belas penelitian memenuhi kriteria inklusi. ET yang sulit secara signifikan mengurangi CPR (OR 0,70; 95%CI: 0,64–0,76; p <0,0001. Semua analisis subkelompok yang telah direncanakan sebelumnya sesuai dengan desain penelitian (studi retrospektif vs prospektif), periode sejarah (studi yang diterbitkan sebelum dan setelah 2010), jenis kateter, frekuensi kasus sulit (> atau <19%) dan tingkat kehamilan (> atau <38%) mengkonfirmasi hubungan yang signifikan. ET yang sulit dikaitkan dengan penurunan CPR yang signifikan. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami cara mencegah atau mengelola situasi klinis umum ini.

Implantasi embrio yang berhasil dalam IVF memerlukan embrio yang layak, endometrium yang reseptif, dan teknik terbaik. Prosedur transfer embrio (ET) secara aklamasi diklaim sangat penting bagi keberhasilan IVF[1]. Prosedurnya harus dipandu oleh USG, preferensi harus diberikan pada kateter lunak, dan embrio harus dilepaskan sekitar 1-2 cm dari fundus rahim.[1–3]. Ada juga bukti yang menunjukkan bahwa pemberian asam hialuronat (HA), Faktor Stimulasi Koloni Granulosit (G-CSF), human Chorionic Gonadotropin (hCG), atau atosiban secara bersamaan dapat meningkatkan tingkat keberhasilan, namun efektivitas suplemen ini masih diperdebatkan.[1,4].

Fanchin dan Ayoubi menegaskan bahwa prosedur ET harus dilakukan selembut mungkin karena trauma apa pun dapat menyebabkan pelepasan oksitosin, meningkatkan kontraktilitas uterus yang mengganggu implantasi.[5]. Namun, perilaku ideal ini tidak selalu memungkinkan. Pemasangan kateter ke dalam rongga rahim mungkin sulit dilakukan karena adanya stenosis dan saluran serviks yang berliku-liku atau adanya anteversi/retroversi uterus yang parah. Kateter keras mungkin diperlukan dalam kasus ini. Dalam situasi yang paling menantang, penerapan forsep tenakulum mungkin diperlukan untuk memungkinkan traksi balik dan memfasilitasi pemasangan kateter. Semua situasi yang menyimpang dari transfer biasa-biasa saja disatukan dalam istilah “ET yang sulit”.

Penelitian yang berbeda telah mengevaluasi dampak kesulitan ET terhadap angka kehamilan klinis, namun hasilnya tidak konsisten. Namun, meta-analisis yang dilakukan pada tahun 2013 dan hanya mencakup lima penelitian menyoroti RR kehamilan klinis sebesar 0,75 (95%CI: 0,66–0,86)[6]. Kami menganggap penting untuk menyelidiki masalah ini lebih lanjut dengan menunda meta-analisis ini karena bukti pasti mengenai efek merugikan dapat memiliki implikasi klinis langsung. Seseorang dapat mempertimbangkan untuk mempelajari intervensi farmakologis yang lebih mendalam yang dapat melemahkan kontraktilitas uterus atau menunda transfer dan pembekuan semua embrio. Pendekatan terakhir ini akan memungkinkan untuk menyesuaikan strategi terbaik untuk memasukkan kateter dalam konteks yang tenang tanpa perlu melakukan transfer (bukti transfer atau tiruan ET). Sebagai catatan, beberapa pusat kesehatan secara sistematis melakukan tiruan ET awal untuk mengidentifikasi perempuan yang berisiko mengalami kesulitan ET dan merencanakan tekniknya dengan lebih baik.

[1]Departemen Kesehatan Ibu dan Anak dan Urologi, Universitas Sapienza, 00161 Roma, Italia.[2]Unit Infertilitas, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italia.[3]Departemen Ilmu Klinis dan Kesehatan Masyarakat, Universitas Milan, Milan, Italia.[*]email: giulia.galati@uniroma1.it

Bahan dan metode

Strategi pencarian

Tinjauan sistematis dan meta-analisis ini dilakukan sesuai dengan pedoman dari Cochrane Collaboration dan mengikuti pedoman Item Pelaporan Pilihan untuk Tinjauan Sistematis dan Meta-Analisis. Protokol penelitian telah didaftarkan secara online di International Prospective Register Systematic Review (nomor PROS-PERO: CRD42023387197). Penerimaan Komite Etik tidak diminta karena hanya data yang dipublikasikan dan dianonimkan yang digunakan.

Pencarian basis data elektronik dilakukan untuk mengidentifikasi artikel yang diterbitkan hingga September 2022. Pubmed dan Medline disaring untuk mengidentifikasi penelitian yang mengevaluasi ET yang sulit dan pengaruhnya terhadap tingkat kehamilan menggunakan kombinasi istilah berikut: "transfer embrio yang sulit" ATAU "transfer embrio yang mudah ". Kriteria inklusi penelitian adalah: (1) Bahasa Inggris, (2) evaluasi hasil, (3) pasien yang menjalani ET segar atau beku-cair, (4) adanya kelompok kontrol. Setelah konfirmasi relevansinya, penelitian dikeluarkan jika melaporkan data sebagian atau tidak lengkap.

Pencarian inklusif secara luas dilakukan pada awalnya diikuti dengan pembatasan berikutnya untuk penelitian yang berfokus pada tingkat kehamilan setelah ET yang sulit selama proses peninjauan judul/abstrak. Data yang disajikan secara eksklusif pada pertemuan tidak dipertimbangkan.

Daftar referensi ulasan dan artikel yang relevan disaring secara manual untuk mengidentifikasi publikasi tambahan yang memenuhi syarat. Artikel yang dipertimbangkan adalah uji klinis acak (RCT), studi observasional prospektif atau retrospektif. Laporan kasus atau seri kecil tidak disertakan. Protokol ini dirancang secara apriori dengan mendefinisikan metode untuk mengumpulkan, mengekstraksi, dan menganalisis data. Penggeledahan elektronik dilakukan secara mandiri oleh dua penyidik (GG dan MR). Semua artikel yang dianggap relevan berdasarkan judul dan abstrak diambil. Selanjutnya, tiga peneliti (CDD, GG, dan LM) secara independen membaca teks lengkap dari artikel yang telah dipilih sebelumnya untuk memverifikasi relevansi artikel tersebut untuk tujuan analisis ini. Studi dikecualikan jika melaporkan kumpulan data parsial atau duplikat. Jika terjadi ketidaksepakatan mengenai penyertaan atau pengecualian studi yang dipilih sebelumnya untuk meta-analisis, atau ketidaksepakatan lainnya selama proses peninjauan, konsensus dicapai setelah diskusi yang melibatkan semua peneliti.

Penilaian kualitas

Penelitian-penelitian tersebut kemudian diklasifikasikan secara kualitatif berdasarkan pedoman yang diterbitkan dalam Cochrane Handbook for Systematic Review of Interventions. Dua penulis (GG dan LM) secara independen menilai penelitian yang dipilih untuk mengetahui risiko bias menggunakan Skala Penilaian Kualitas Newcastle – Ottawa.

Penulis juga menilai kualitas bukti menggunakan pendekatan Grading of Rekomendasi Assessment, Development and Evaluation (GRADE)[7]. Kualitas bukti diturunkan satu tingkat untuk kekhawatiran yang serius dan dua tingkat untuk kekhawatiran yang sangat serius karena risiko bias, inkonsistensi, tidak langsung, ketidaktepatan, dan bias publikasi.

Hasil

Hasil utamanya adalah Tingkat Kehamilan Klinis (CPR), yang didefinisikan sebagai adanya kantung kehamilan intrauterin. Hasil kedua adalah angka kelahiran hidup. Analisis subkelompok berikut telah direncanakan sebelumnya: cara perekrutan (retrospektif atau prospektif), periode penelitian (dibagi berdasarkan tanggal publikasi, sebelum dan sesudah 2010), jenis kateter (kateter Cook atau Wallace), frekuensi kasus sulit (menggunakan median untuk membagi menjadi dua kelompok) dan CPR pada kelompok kontrol (menggunakan median untuk membagi menjadi dua kelompok). Jika dipilih sejumlah penelitian yang tidak berpasangan, maka penelitian yang sesuai dengan median tersebut dimasukkan ke dalam kelompok di atas median tersebut.

Dampak sulitnya transfer embrio terhadap kehamilan klinis dinyatakan dengan menggunakan odds rasio (OR) dengan CI 95%.

Inkonsistensi hasil penelitian diukur menggunakan Cochrane Q dan$SAYA^2$statistik[8]. Perkiraan risiko digabungkan dalam meta-analisis menggunakan model efek tetap ketika heterogenitas yang ditemukan di antara penelitian tidak ada hingga sedang (0% $\leq SAYA^2 <$ 30%). Ketika heterogenitasnya sedang, substansial, atau besar ($I^2 \geq$ 30%), metode DerSimonian dan Laird digunakan[9,10]untuk model efek acak. Semua analisis dilakukan menggunakan Review Manager (RevMan) [Program komputer], Versi 5.4, The Cochrane Collaboration, 2020.

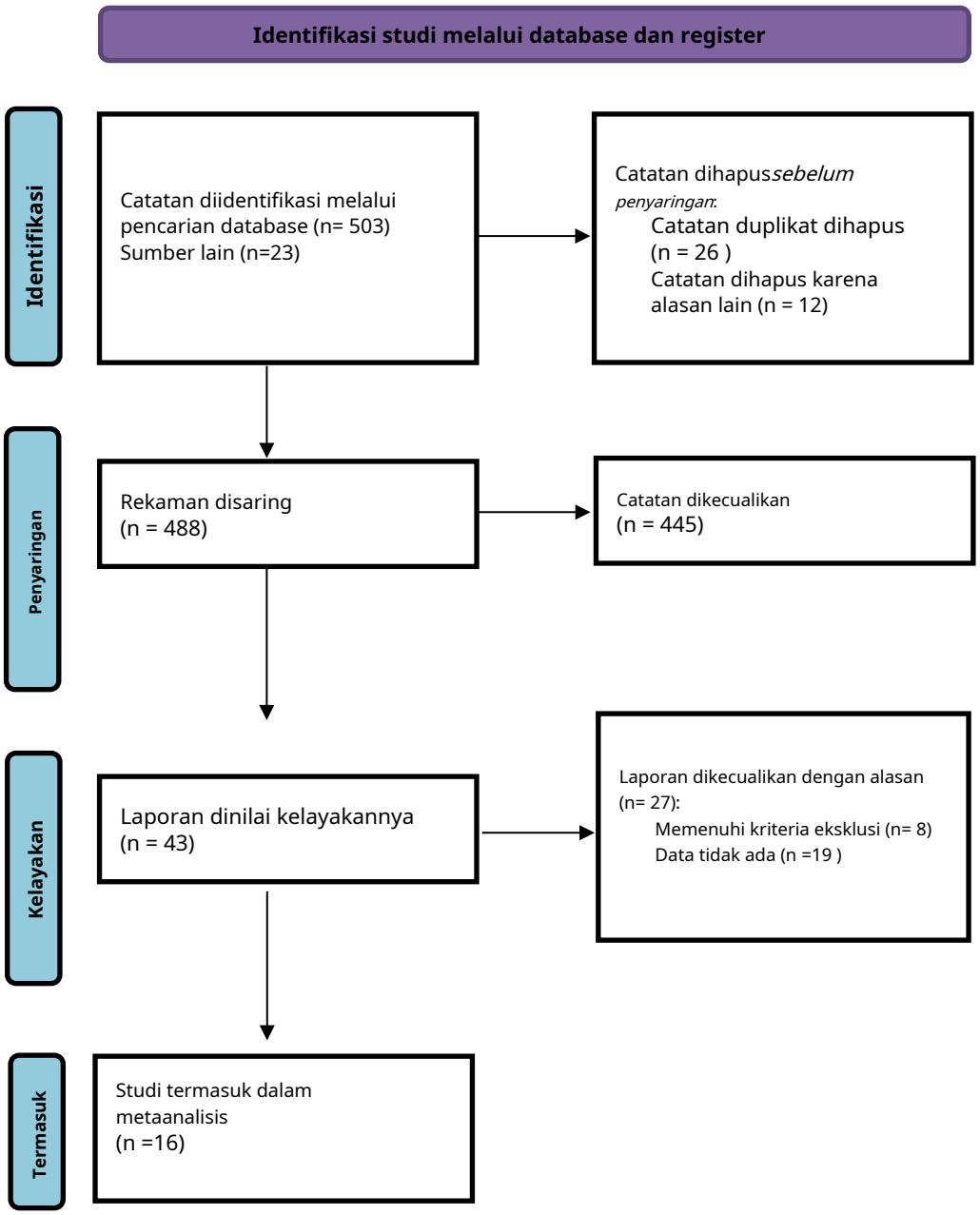
Hasil

Seleksi studi

Pencarian database elektronik kami awalnya menghasilkan 526 artikel. Penyaringan judul dan abstrak memilih total 43 studi yang memenuhi syarat untuk evaluasi teks lengkap. Dua puluh tujuh di antaranya dikeluarkan sebagaimana dirinci dalam diagram alur PRISMA pada Gambar. 1. Enam belas penelitian memenuhi kriteria inklusi: karakteristik utamanya ditunjukkan pada Tabel1.

Karakteristik studi

Ke-16 penelitian tersebut dimasukkan dalam meta-analisis yang mencakup total 29.947 pasien[11-26]. ET dianggap sulit pada 3544 kasus (11,83%). Lima merupakan studi prospektif terkontrol dan sebelas merupakan studi retrospektif. Semua penelitian melaporkan tingkat kehamilan klinis. Lima penelitian juga melaporkan angka keguguran dan hanya tujuh yang melaporkan angka kelahiran hidup. Definisi sulitnya transfer embrio sangat mirip. Semua pasien, kecuali satu orang, mendefinisikan kesulitan tersebut sebagai perlunya tindakan tambahan (penggunaan kateter keras, stylet lunak, atau tenakulum). Hanya satu penelitian yang merujuk pada penilaian subjektif dari operator[13]. Tiga penelitian melakukan ET menggunakan kateter Cook dan tujuh penelitian menggunakan kateter Wallace. Dalam empat studi periode pendaftaran berkisar antara tahun 1998 hingga 2005, dalam dua belas studi berkisar antara tahun 2016 hingga 2017.



Gambar 1. Diagram alur PRISMA untuk identifikasi dan inklusi/eksklusi studi.

Risiko bias dan kualitas hasil penilaian

Hasil yang diperoleh dari penilaian risiko bias kami untuk seluruh 16 studi dirangkum dalam Tabel Tambahan 1. Secara keseluruhan, penilaian kualitas menunjukkan risiko bias yang rendah. Di antara sembilan bintang yang berlaku yang menilai tiga kategori utama seleksi, perbandingan dan hasil, studi yang memenuhi syarat menerima delapan.

Kualitas bukti menurut sistem GRADE rendah di semua penelitian.

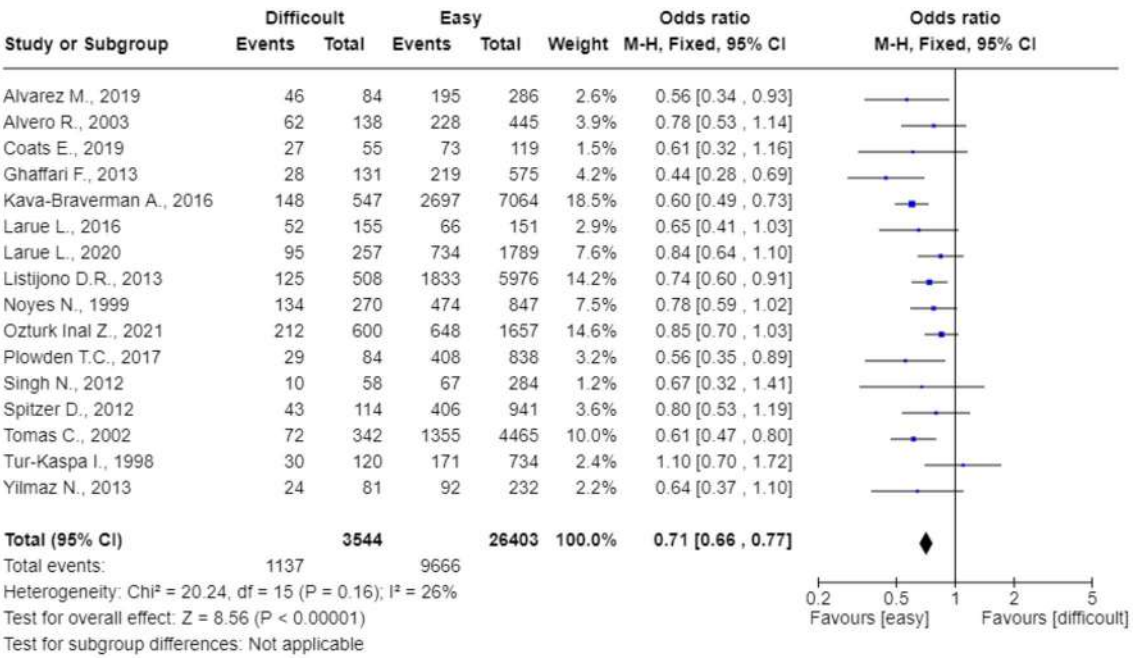
Hasil sintesis

Ke-16 penelitian termasuk wanita yang melakukan ET telah dimeta-analisis[11–26]. Kelompok ET yang sulit secara signifikan mengurangi angka kehamilan. OR yang dikumpulkan adalah 0,71 (95%CI: 0,66-0,77; p <0,0001) (Gbr.2). Heterogenitas untuk perbandingan ini adalah $I^2$26%. Ketika berfokus pada angka kelahiran hidup (n = 7 penelitian), OR yang dikumpulkan adalah 0,68 (95%CI: 0,59–0,77; p = 0,00001) dan heterogenitasnya adalah $I^2$9% (Gbr.3).

Analisis subkelompok yang direncanakan sebelumnya ditunjukkan pada Gambar.4. Semuanya signifikan secara statistik (p <0,0001) dan heterogenitas bervariasi antara 0 dan 42%. OR yang dikumpulkan untuk calon[14–17,21]dan studi retrospektif[11–13,18–20,22–26] adalah 0,76 (95%CI: 0,66–0,88) dan 0,69 (95%CI: 0,62–0,75), masing-masing (Gbr.4A). OR yang dikumpulkan untuk penelitian yang diterbitkan sebelum (n = 4) dan setelah (n = 12) 2010 adalah 0,74 (95%CI: 0,63–0,87) dan 0,70 (95%CI: 0,64–0,77), masing-masing (Gbr.4B). OR yang dikumpulkan untuk studi di mana ET dilakukan menggunakan Cook (n = 3) atau Wallace

Pengarang	Tahun	Desain studi	Negara	Periode rekrutmen	Ukuran sampel	Hasil
Alvarez M.Sejarah pertemuanAlvarez M	2019	Studi observasional retrospektif	Spanyol	2014–2016	370	CPR, LBR
Alvero R	2003	Studi observasional retrospektif	Amerika Serikat	1998–1999	583	CPR
mantel e	2019	Studi kohort prospektif	Inggris	2014–2016	174	CPR, LBR
Ghaffari F	2013	Studi kohort prospektif	Iran	2009–2010	706	CPR
Kava-Braverman A	2016	Studi observasional retrospektif	Spanyol	2009–2015	7611	CPR, LBR
Larue L	2016	Studi observasional prospektif	Perancis	2010–2012	306	CPR
Larue L	2020	Studi observasional prospektif	Perancis	2014–2020	2046	CPR
Listijono DR	2013	Studi observasional retrospektif	Australia	2005–2010	6484	CPR, LBR
Noyes N	1999	Studi observasional retrospektif	Amerika Serikat	1995–1998	1117	CPR
Bajak TC	2017	Studi observasional retrospektif	Amerika Serikat	2012–2013	922	CPR, LBR
Öztürk İnal Z	2021	Studi kohort prospektif	Turki	2012–2017	2257	CPR
Singh N	2012	Studi observasional retrospektif	India	2008–2010	342	CPR
Spitzer D.Sejarah pertemuanSpitzer D	2012	Studi observasional retrospektif	Austria	2005–2009	1055	CPR, LBR
Tomas C	2002	Studi observasional retrospektif	Finlandia	1994–2000	4807	CPR
Tur-Kaspa I	1998	Studi observasional retrospektif	Israel	1994–1996	854	CPR, LBR
Yilmaz N.Sejarah pertemuanYilmaz N	2013	Studi observasional retrospektif	Turki	2010–2012	313	CPR

Tabel 1. Karakteristik studi yang disertakan. CPR, tingkat kehamilan klinis; LBR, angka kelahiran hidup.



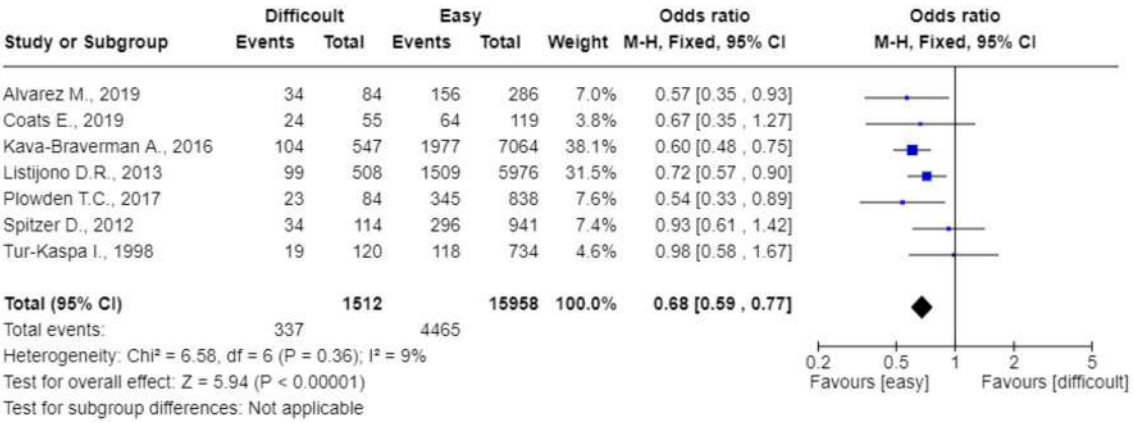
Gambar 2. Pengaruh Kesulitan Transfer Embrio terhadap angka kehamilan klinis.

(n = 7) kateter adalah 0,69 (95%CI: 0,58–0,80) dan 0,68 (95%CI: 0,60–0,77), masing-masing (Gbr.4C). OR yang dikumpulkan untuk penelitian dengan frekuensi kasus sulit lebih besar (n = 8) dan kurang (n = 8) dari 18% (cut-off dipilih berdasarkan median) adalah 0,73 (95%CI: 0,65–0,83) dan 0,70 (95%CI: 0,63–0,77), masing-masing (Gbr.4D). OR yang dikumpulkan untuk penelitian dengan tingkat kehamilan klinis pada kelompok kontrol lebih besar (n = 9) dan kurang (n = 7) dari 38% (batas dipilih berdasarkan median) adalah 0,77 (95%CI: 0,69–0,86) dan 0,65 (95%CI: 0,58–0,73), masing-masing (Gbr.4E).

Diskusi

Meta-analisis ini mengkonfirmasi temuan sebelumnya yang menunjukkan bahwa kesulitan ET dikaitkan dengan penurunan signifikan dalam kemungkinan kehamilan klinis[6]. Perkiraan dampaknya adalah pengurangan relatif sebesar 30%, suatu angka yang secara klinis luar biasa dan relevan. Perlu diketahui, amplitudo rendah dari 95%CI (0,64–0,76) memungkinkan kita menyimpulkan bahwa pengurangan relatif setidaknya sebesar 24%. Dengan kata lain, kesulitan ET dikaitkan dengan terbuangnya embrio yang mampu ditanamkan pada setidaknya satu dari empat wanita.

Meta-analisis sebelumnya yang diterbitkan pada tahun 2013 hanya mencakup lima penelitian (perkiraannya kurang tepat), sehingga penulis tidak dapat melakukan analisis subkelompok dan hasilnya pasti mengacu pada seri yang lebih lama.[6]. Hasil kami memperluas temuan kami dengan melaporkan perkiraan dampak merugikan yang lebih tepat (kami menyertakan 16



Gambar 3. Pengaruh Sulitnya Transfer Embrio terhadap Angka Kelahiran Hidup.

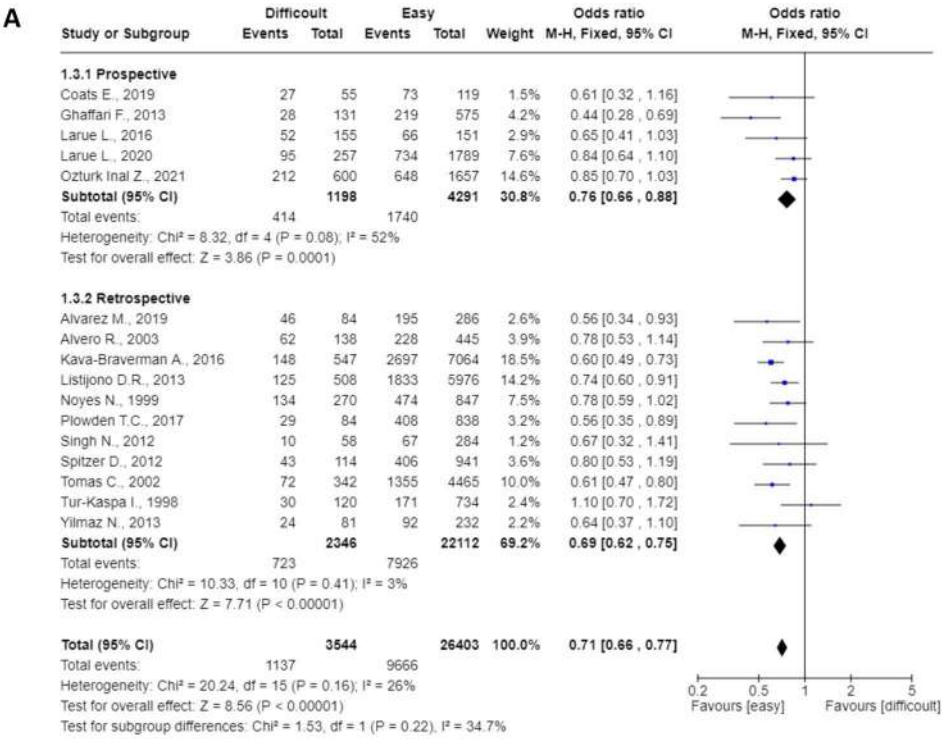
studi) dan dengan menyoroti bahwa kemajuan dalam instrumentasi IVF belum mengatasi masalah ini. Hasilnya serupa terlepas dari jenis kateter yang digunakan dan, yang paling penting, analisis subkelompok historis (yaitu, ketika kami mengevaluasi penelitian secara terpisah yang diterbitkan sebelum dan sesudah tahun 2010) tidak menyoroti adanya perubahan dari waktu ke waktu. Bahkan terdapat sedikit kecenderungan dampak yang lebih relevan dalam penelitian terbaru (OR = 0,68, 95%CI: 0,62–0,75).

Analisis subkelompok tambahan selalu mengkonfirmasi hubungan yang signifikan antara kesulitan ET dengan penurunan angka kehamilan klinis. Kami gagal mengidentifikasi subkelompok mana pun yang tidak menunjukkan efek ini. Yang menarik adalah pengamatan bahwa efeknya tidak bergantung pada tingkat keberhasilan lokal dan frekuensi kesulitan ET. Dampak negatifnya teridentifikasi pada kedua Pusat dengan tingkat keberhasilan yang lebih tinggi dan lebih rendah dan pada pusat-pusat dengan tingkat kesulitan ET yang lebih tinggi dan lebih rendah. Berdasarkan temuan terakhir ini, kita tergoda untuk berspekulasi bahwa keahlian tim (yang mungkin tercermin dari tingkat kesulitan ET yang lebih rendah) pada akhirnya mungkin memiliki manfaat yang relevan secara klinis. Perlu diperhatikan, terdapat bukti dari perbandingan intra-kelompok bahwa tingkat keberhasilan mungkin berbeda di antara dokter di pusat yang sama[27].

Tujuan utama ET adalah memasukkan embrio ke dalam rongga rahim dengan hati-hati dan pada posisi yang benar untuk memaksimalkan kemungkinan implantasi. Pedoman American Society for Reproductive Medicine (ASRM) menggambarkan tingkat kehamilan yang lebih baik dengan beberapa tindakan, seperti penggunaan USG perut selama pemindahan, pembuangan lendir serviks, penggunaan kateter lunak dan deposisi embrio pada usia sekitar 1 –2 cm dari fundus uteri[2]. Baru-baru ini, D'Angelo dkk.[3] memberikan kepada ESHRE (Masyarakat Reproduksi dan Embriologi Manusia Eropa) gambaran umum aspek teknis ET, termasuk persiapan sebelum ET, prosedur itu sendiri, perawatan pasca prosedur, dan pentingnya kinerja dokter. Rekomendasi mereka secara keseluruhan tumpang tindih dengan rekomendasi ASRM. Anehnya, kedua makalah tersebut tidak membahas situasi ET yang sulit. Dalam kebanyakan kasus, situasi ini tidak terduga dan dokter yang melakukan pemindahan harus bertentangan dengan dogma kelembutan. Dia mungkin memerlukan kateter keras atau harus menggunakan tenakulum. Tidak ada rekomendasi yang diberikan untuk memandu dokter dalam situasi umum ini. Hal ini mengejutkan karena setidaknya ada dua pendekatan yang perlu mendapat perhatian. Pertama, kita dapat mempertimbangkan antagonis reseptor oksitosin yang dapat meredam kontraksi uterus. Terdapat bukti bahwa atosiban atau agen lain dari keluarga yang sama dapat meningkatkan tingkat keberhasilan ET, khususnya pada wanita dengan kegagalan implantasi berulang.[1,28]. Namun, kemungkinan untuk menggunakan obat ini secara eksklusif dalam kasus transfer embrio yang sulit, setelah pemasangan kateter yang sulit namun pasti tetapi sebelum pelepasan embrio belum diteliti. Menurut pendapat kami, pendekatan ini mungkin rasional dan patut diselidiki. Kedua, seseorang dapat mempertimbangkan untuk menunda transfer, membekukan embrio, dan menunda prosedur ke bulan berikutnya (mengubah transfer menjadi transfer tiruan). Hal ini lebih sulit bagi perempuan dan mungkin memerlukan pembekuan kembali embrio yang baru saja dicairkan. Namun, hal ini memungkinkan bulan berikutnya untuk lebih siap, dengan melibatkan sebagian besar dokter ahli, dan mengetahui terlebih dahulu kemungkinan kesulitan, lintasan yang harus diikuti kateter, dan kateter yang paling cocok untuk digunakan. Uji coba acak terkontrol diperlukan, namun taruhannya bernilai secara klinis, mengingat intervensi ini berpotensi meningkatkan tingkat keberhasilan pada populasi ini dengan OR 1,4 (1/0,7). Sedikitnya perhatian yang diberikan pada topik ini sungguh mengejutkan.

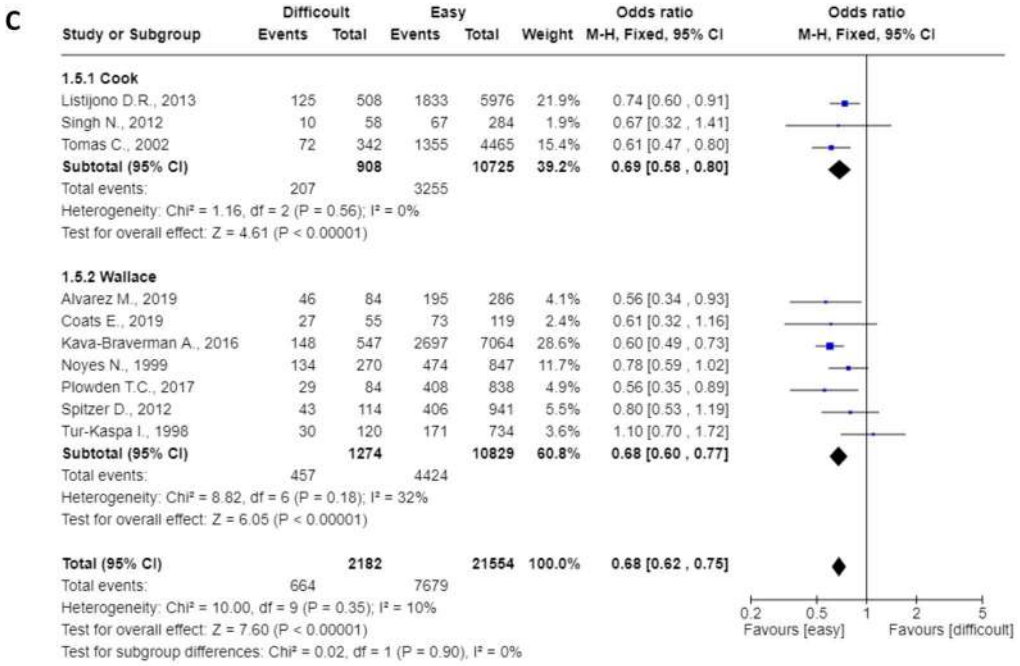
Beberapa kekuatan dan keterbatasan meta-analisis ini patut untuk dikenali dan didiskusikan. Mengingat hal yang pertama, ini adalah tinjauan sistematis dan meta-analisis terbesar mengenai dampak sulitnya transfer embrio terhadap hasil reproduksi. Yang sebelumnya mencakup sepertiga makalah yang dipilih untuk yang sekarang (5 berbanding 15). Selain itu, bukti yang ada cukup konsisten, dan heterogenitas pada umumnya terbatas, sehingga mendukung kekokohan kesimpulan kami.

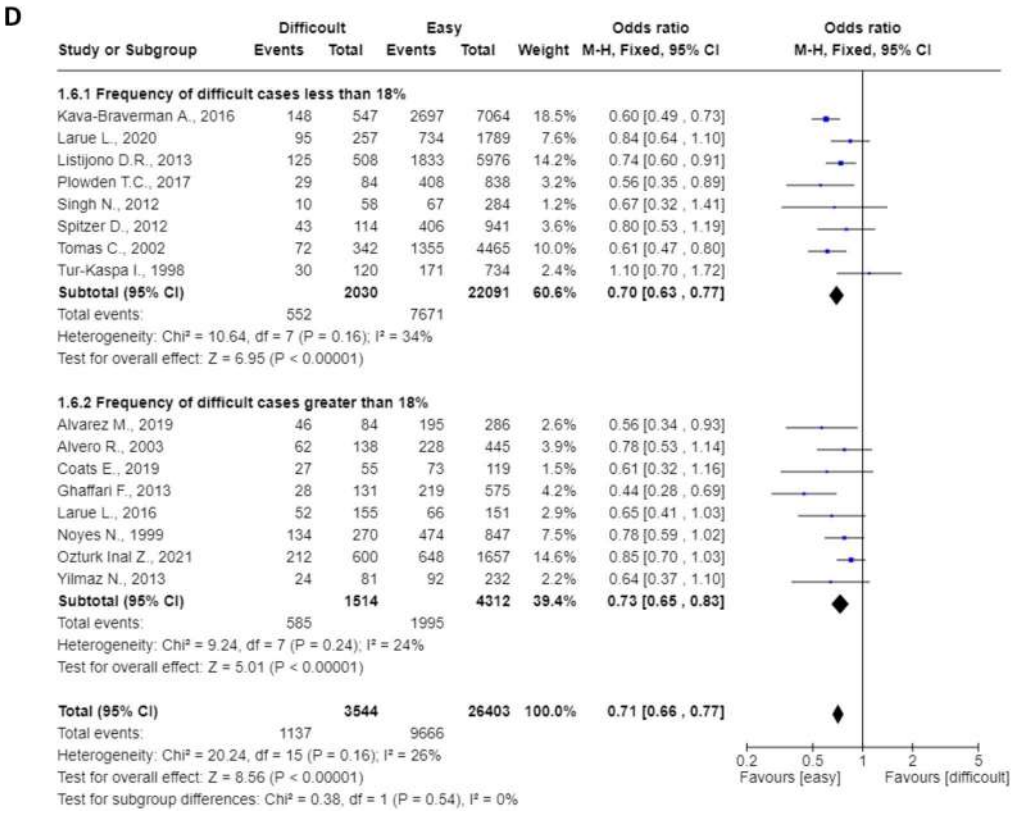
Di sisi lain, beberapa keterbatasan harus diakui. Pertama, kriteria yang digunakan untuk mendefinisikan ET yang sulit tidaklah tepat. Sebagian besar merujuk pada perlunya tindakan tambahan, sebuah definisi yang pragmatis namun tidak tepat dan sulit direproduksi. Tidak mengherankan, meskipun terdapat definisi teoretis yang serupa ("perlunya tindakan tambahan"), angka tersebut sangat berbeda di antara studi-studi tertentu, bervariasi antara 7 dan 32%. Keterbatasan kedua adalah sebagian besar data hanya berasal dari dua penelitian[12,18]. Namun, ketika kedua penelitian ini tidak disertakan, hubungan yang signifikan tetap ada, dan besarnya serupa (data tidak ditampilkan). Ketiga, kualitas bukti yang tersedia belum optimal. Sekalipun Skala Penilaian Kualitas Newcastle–Ottawa mengutip dengan baik semua penelitian yang disertakan, tidak ada satupun yang mencapai standar yang ditetapkan sebagai kualitas sedang-tinggi menurut sistem GRADE. Selain itu, data mengenai angka kelahiran hidup (standar emas untuk penelitian tentang IVF) tersedia dalam kurang dari separuh penelitian. Namun, mengingat pertanyaan spesifik dari penelitian ini (implantasi embrio), kami tidak menganggap batasan ini



Gambar 4.(**A**) cara rekrutmen (retrospektif atau prospektif); (**B**) masa studi (dibagi menurut tanggal publikasi, sebelum dan sesudah tahun 2010); (**C**) jenis kateter (kateter Cook atau Wallace); (**D**) frekuensi kasus sulit (menggunakan median untuk membagi menjadi dua kelompok); (**E**) CPR pada kelompok kontrol (menggunakan median untuk membagi menjadi dua kelompok).

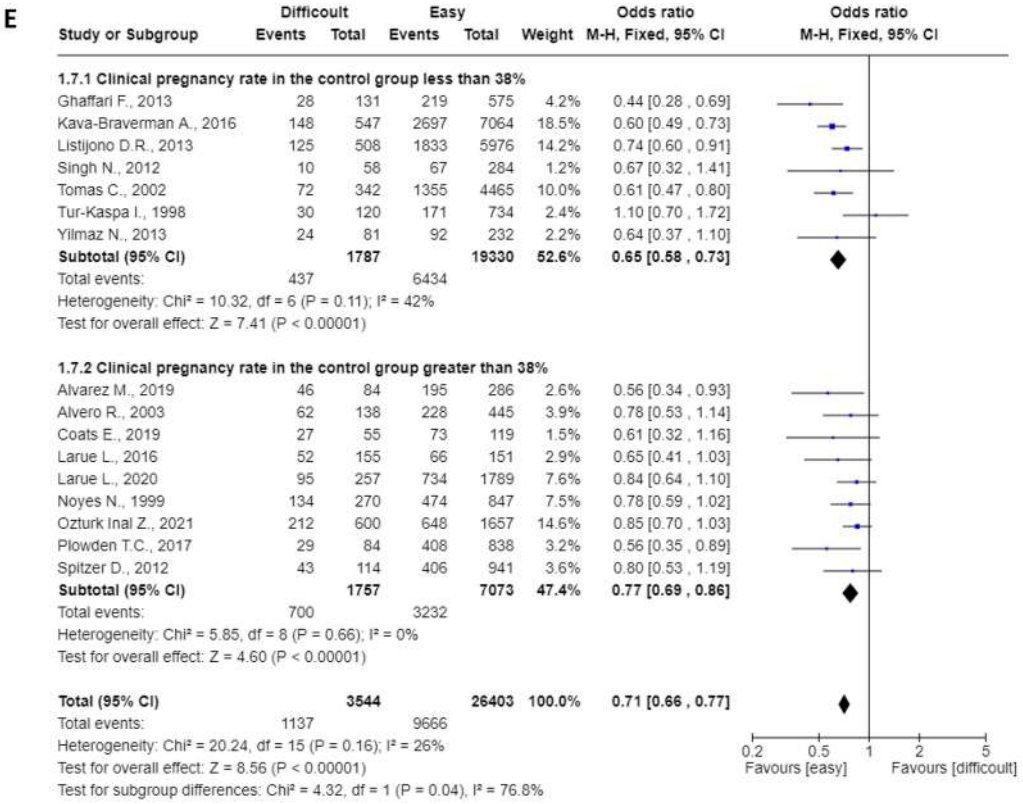
memiliki relevansi yang besar dan, oleh karena itu, kami memutuskan secara apriori untuk angka kehamilan klinis dibandingkan angka kelahiran hidup sebagai hasil utama. Keempat, kebijakan klinis dari berbagai penelitian sangat bervariasi. Yang paling relevan di sini adalah





Gambar 4.(lanjutan)

dimasukkannya siklus segar dan siklus beku dan, di antaranya, kedua wanita yang diobati dengan terapi penggantian hormon dan siklus alami. Kami tidak dapat mengesampingkan bahwa dampak kesulitan ET terhadap tingkat keberhasilan dapat bervariasi sesuai dengan kondisi klinis yang terkait dengan transfer. Kami tidak dapat menilai aspek penting ini dalam meta-analisis kami. Yang terakhir, desain pengamatan kami tidak memungkinkan kami menyimpulkan hubungan sebab akibat antara perlunya manuver tambahan dan peluang keberhasilan. Kami tidak dapat mengesampingkan bahwa kekhasan anatomi yang membuat pemindahan menjadi lebih sulit juga dapat mengganggu implantasi embrio. Perbandingan RCT



Gambar 4.(lanjutan)

teknik transfer yang lembut dan agresif diperlukan untuk memberikan jawaban yang pasti, namun jenis penelitian ini masih bisa diperdebatkan secara etis.

Sebagai kesimpulan, penelitian kami secara tidak langsung mendukung gagasan bahwa ET harus dilakukan dengan lembut, dengan menghindari penggunaan instrumen tambahan yang dapat memfasilitasi akses ke rongga endometrium namun secara bersamaan dapat mempengaruhi implantasi embrio. Mengingat pentingnya ET sebagai langkah akhir siklus IVF, segala upaya harus dilakukan untuk mengoptimalkan prosedur, memprediksi dan mengurangi kemungkinan menghadapi kesulitan, serta mengatasi dampak sekunder yang merugikan jika akses sulit dilakukan. Penelitian lebih lanjut harus dirancang untuk mencapai tujuan penting ini yang memungkinkan peningkatan hasil IVF secara signifikan.

Ketersediaan data

Kumpulan data yang dihasilkan selama dan/atau dianalisis selama penelitian ini tersedia dari penulis terkait berdasarkan permintaan yang masuk akal.

Diterima: 30 Maret 2023; Diterima: 5 Desember 2023
Published online: 14 December 2023

Referensi

1. Tyler, B.*dkk.*Intervensi untuk mengoptimalkan transfer embrio pada wanita yang menjalani konsepsi bantuan: Tinjauan sistematis dan meta-analisis yang komprehensif.*Bersenandung. mereproduksi. Memperbarui***28**, 480–500 (2022).
2. Penzias, A.*dkk.*Melakukan transfer embrio: Sebuah pedoman.*Subur. Steril.***107**, 882–896 (2017).
3. D'Angelo, A., Panayotidis, C., Alteri, A., Mcheik, S. & Veleva, Z. Bukti dan konsensus mengenai aspek teknis transfer embrio. *Bersenandung. mereproduksi. Membuka***2022**, 4 (2022).
4. Busnelli, A., Somigliana, E., Cirillo, F., Baggiani, A. & Levi-Setti, PE Kemanjuran terapi dan intervensi untuk kegagalan implantasi embrio berulang: Tinjauan sistematis dan meta-analisis.*Sains. Reputasi.***11**, 1747 (2021).
5. Fanchin, R. & Ayoubi, JM Dinamika uterus: Dampak terhadap proses reproduksi manusia.*mereproduksi. Bioma. On line***18**, S57–S62 (2009).
6. Phillips, JAS, Martins, WP, Nastri, CO & Raine-Fenning, NJ Transfer embrio yang sulit atau darah pada kateter dan hasil reproduksi yang dibantu: Tinjauan sistematis dan meta-analisis.*euro. J. Obstetri. Ginekol. mereproduksi. biologi.***168**, 121–128.https://doi. org/10.1016/j.ejogrb.2012.12.030(2013).
7. David Atkins, DB*dkk.*Menilai kualitas bukti dan kekuatan rekomendasi.*BMJ***328**, 1490 (2004).
8. Higgins, JPT*dkk. Buku Pegangan Cochrane untuk Tinjauan Sistematis Intervensi versi 6.3. Cochrane*(2022). tersedia dari https://www.training.cochrane.org/handbook.
9. DerSimonian, R. & Kacker, R. Model efek acak untuk meta-analisis uji klinis: Pembaruan.*Penghinaan. Klinik. Percobaan***28**, 105–114 (2007).
10. DerSimonian, R. & Laird, N. Meta-analisis dalam uji klinis.*Klinik Kontrol. Percobaan***7**, 177–188 (1986).
11. Alvarez, M.*dkk.*Pengaruh kesulitan transfer embrio pada angka kelahiran hidup dipelajari dalam transfer blastokista euploid yang dipanaskan dengan vitrifikasi. *mereproduksi. Bioma. On line***39**, 940–946 (2019).

12. Kava-Braverman, A.*dkk.*Apa itu transfer yang sulit? Analisis terhadap 7.714 transfer embrio: Dampak manuver selama transfer embrio terhadap tingkat kehamilan dan usulan penilaian objektif.*Subur. Steril.***107**, 657-663.e1 (2017).
13. Alvero, R., Hearns-Stokes, RM, Catherino, WH, Leondires, MP & Segars, JH Kehadiran darah dalam kateter transfer berdampak negatif pada hasil transfer embrio.*Bersenandung. mereproduksi.***18**, 1848–1852 (2003).
14. Mantel, E.*dkk.*Mengkualifikasi kesulitan transfer embrio dengan skala analog visual dan menilai dampaknya terhadap hasil IVF. *Bersenandung. Subur.***22**, 177–181 (2019).
15. Ghaffari, F., Kiani, K., Bahmanabadi, A. & Akhoond, M.*Perbandingan Hasil Transfer Embrio yang Mudah dan Sulit dalam Siklus Fertilisasi In Vitro Int. J.Subur. Steril.***6**, 232–237 (2013).
16. Larue, L.*dkk.*Evaluasi strategi untuk transfer embrio yang sulit dari serangkaian prospektif sebanyak 2.046 transfer.*Perwakilan FS.***2**, 43–49 (2021).
17. Larue, L.*dkk.*Menyebabkan kesulitan anatomi transfer embrio di FIV.*J. Ginekol. Kebidanan. Bersenandung. mereproduksi.***46**, 77–86 (2017).
18. Listijono, DR, Boylan, T., Cooke, S., Kilani, S. & Chapman, MG Analisis dampak kesulitan transfer embrio terhadap angka kelahiran hidup, menggunakan sistem penilaian standar.*Bersenandung. Subur.***16**, 211–214 (2013).
19. Noyes, N., Licciardi, F., Grifo, J., Krey, L. & Berkeley, A.*Hasil Fertilisasi In Vitro Dibandingkan dengan Kesulitan Transfer Embrio: Pendekatan Baru pada Serviks yang Melarang*(1999).
20. Bajak, TC*dkk.*Apakah adanya darah pada kateter atau tingkat kesulitan transfer embrio mempengaruhi kelahiran hidup?. *mereproduksi. Sains.***24**, 726–730 (2017).
21. Akhir, Z.Ö. & İnal, HA Pengaruh teknik transfer embrio pada tingkat kehamilan dalam siklus injeksi sperma fertilisasi in vitro-intrasitoplasma: Sebuah studi kohort prospektif.*orang Turki. J.Kebidanan. Ginekol.***18**, 30–36 (2021).
22. Singh, N., Gupta, P., Mittal, S. & Malhotra, N. Korelasi kesulitan teknis selama transfer embrio dengan tingkat kehamilan klinis. *J.Hum. mereproduksi. Sains.***5**, 258–261 (2012).
23. Spitzer, D.*dkk.*Pengaruh kualitas transfer embrio terhadap kehamilan dan angka kelahiran hidup.*J. Membantu Reprod. Genet.***29**, 131–135 (2012).
24. Tomás, C., Tikkinen, K., Tuomivaara, L., Tapanainen, JS & Martikainen, H. Tingkat kesulitan transfer embrio merupakan faktor independen untuk memprediksi kehamilan.*Bersenandung. mereproduksi.***17**, 14.https://academic.oup.com/humrep/article/17/10/2632/607745 (2002).
25. Tur-Kaspa, I.*dkk.*Transfer embrio berurutan yang sulit atau berulang tidak berdampak buruk pada tingkat atau hasil kehamilan fertilisasi in-vitro. *Bersenandung. mereproduksi.***13**, 2452 (1998).
26.Yilmaz, N.*dkk.*Pengaruh teknik transfer embrio panduan eksternal afterloaded terhadap tingkat kehamilan dalam siklus transfer embrio tunggal.*J.Turki. Ginekol Jerman. Asosiasi.***14**, 153–156 (2013).
27. Cirillo, F.*dkk.*Faktor manusia: Apakah operator yang melakukan transfer embrio berdampak signifikan terhadap hasil siklus?. *Bersenandung. mereproduksi.***35**, 275–282 (2020).
28. Neumann, K. & Griesinger, G. Apakah pemberian antagonis reseptor oksitosin di sekitar transfer embrio berhubungan dengan keberhasilan pengobatan IVF? Tinjauan sistematis dan meta-analisis.*mereproduksi. Bioma.***43**, 2021 (2021).

Kontribusi penulis

GG menyusun tinjauan sistematis dan metaanalisis ini dengan berkonsultasi dengan ES dan LMGG, LM dan CD D. telah mengumpulkan data dan melakukan tinjauan sistematis. MR melakukan analisis statistik. GG menulis draf naskah pertama. ES dan LM memberikan kritik terhadap naskah tersebut. Semua penulis meninjau naskah dan menyetujui versi final untuk diserahkan.

Pendanaan

Penelitian ini sebagian didanai oleh Kementerian Kesehatan Italia—IRCCS Penelitian Saat Ini.

Kepentingan yang bersaing

Para penulis menyatakan tidak ada kepentingan yang bersaing.

Informasi tambahan

Informasi tambahan Versi online berisi materi tambahan yang tersedia dihttps://doi.org/10.1038/s41598-023-49141-x.

Korespondensidan permintaan material harus ditujukan kepada GG

Informasi cetak ulang dan izintersedia diwww.nature.com/reprints.

Catatan penerbit Springer Nature tetap netral sehubungan dengan klaim yurisdiksi dalam peta yang dipublikasikan dan afiliasi kelembagaan.

Akses terbuka Artikel ini dilisensikan di bawah Lisensi Internasional Creative Commons Attribution 4.0, yang mengizinkan penggunaan, berbagi, adaptasi, distribusi, dan reproduksi dalam media atau format, selama Anda memberikan kredit yang sesuai kepada penulis asli dan sumbernya, berikan tautan ke lisensi Creative Commons, dan tunjukkan jika ada perubahan. Gambar atau materi pihak ketiga lainnya dalam artikel ini termasuk dalam lisensi Creative Commons artikel tersebut, kecuali dinyatakan lain dalam batas kredit materi tersebut. Jika materi tidak termasuk dalam lisensi Creative Commons artikel dan tujuan penggunaan Anda tidak diizinkan oleh peraturan perundang-undangan atau melebihi penggunaan yang diizinkan, Anda harus mendapatkan izin langsung dari pemegang hak cipta. Untuk melihat salinan lisensi ini, kunjungihttp://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© Penulis 2023

Bagian Tematik: Pertemuan Tahunan ke-36 Masyarakat Teknologi Embrio Brasil (SBTE)

Pentingnya estradiol praovulasi pada penerimaan uterus dan fungsi luteal

George Allen Perry[1]*, Jaclyn Nicole Ketchum[1,2], Lacey Kay Puyuh[1,2]

[1]Texas A&M AgriLife Research, Overton, Texas, Amerika Serikat
[2]Departemen Ilmu Hewan, Texas A&M University, College Station, Texas, Amerika Serikat

Cara mengutip: Perry GA, Ketchum JN, Puyuh LK. Pentingnya estradiol praovulasi pada penerimaan uterus dan fungsi luteal. Reprod Anim. 2023;20(2):e20230061. https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0061

Abstrak

Hewan yang mengalami estrus mempunyai keberhasilan kebuntingan yang lebih besar dibandingkan dengan hewan yang tidak mengalami estrus sebelum adanya fixed-time AI (FTAI). Estradiol disintesis dalam folikel ovarium sapi di bawah regulasi gonadotropin dan secara langsung dan tidak langsung dapat mengatur penerimaan uterus dan fungsi luteal. Konsentrasi estradiol di FTAI berdampak pada ekspresi gen oviduktal dan dilaporkan memainkan peran penting dalam menentukan waktu penerimaan uterus. Perubahan ini dilaporkan berdampak pada pH rahim dan transportasi sperma ke tempat pembuahan. Setelah pembuahan, estradiol praovulasi dilaporkan meningkatkan kelangsungan hidup embrio dengan memediasi perubahan aliran darah uterus, ketebalan endometrium, dan perubahan histotrof. Sapi dengan konsentrasi estradiol yang lebih besar pada saat ovulasi yang diinduksi GnRH juga memiliki ukuran folikel dominan yang lebih besar dan konsentrasi progesteron yang bersirkulasi lebih besar pada hari ke 7. Oleh karena itu, tidak mungkin untuk secara akurat menentukan manfaat individu dari konsentrasi estradiol yang lebih besar sebelum ovulasi dan konsentrasi progesteron yang lebih besar setelahnya. ovulasi hingga pembentukan kehamilan, karena kedua pengukuran ini dikacaukan. Penelitian telah menunjukkan pentingnya terjadinya dan waktu peningkatan konsentrasi estradiol praovulasi, namun peningkatan konsentrasi estradiol dengan suplementasi mungkin tidak cukup untuk meningkatkan kesuburan. Peningkatan produksi estradiol oleh folikel praovulasi mungkin diperlukan untuk meningkatkan kesuburan melalui pengaturan transportasi sperma, pembuahan, sekresi saluran telur, lingkungan rahim, dan kelangsungan hidup embrio.

Kata kunci:estradiol, rahim, korpus luteum, saluran telur.

Perkenalan

Sinkronisasi estrus dan AI tetap merupakan bioteknologi reproduksi yang penting dan dapat diterapkan secara luas pada sapi (Seidel, 1995). Namun, waktu dan tenaga menghalangi pemanfaatannya secara luas. Dengan berkembangnya protokol FTAI, deteksi estrus tidak diperlukan karena agonis hormon pelepas gonadotropin (GnRH) dapat menyebabkan ovulasi (Ryan et al., 1998). Namun demikian, keberhasilan penerapan protokol FTAI memerlukan sebagian besar betina untuk mengekspresikan estrus, karena hubungan positif antara ekspresi estrus pada saat inseminasi dan keberhasilan kebuntingan telah ditemukan pada sapi potong dan sapi perah (Vasconcelos et al., 2001; Perry dkk., 2005; Lopes dkk., 2007; Perry dkk., 2007). Hewan yang mengalami estrus rata-rata memiliki keberhasilan kebuntingan 27% lebih besar dibandingkan hewan yang tidak mengalami estrus (Richardson et al., 2016). Selain itu, teknologi transfer embrio memberikan peluang untuk meningkatkan jumlah keturunan yang unggul secara genetik dalam jangka waktu yang lebih singkat (Lohuis, 1995; Hasler, 2014); namun, agar teknologi ini berhasil, betina penerima estrus perlu mengekspresikan estrus karena kehamilan per transfer embrio (P/ET) lebih besar di antara penerima estrus (Baruselli dkk., 2003; Bó dan Cedeño, 2018).

* Penulis koresponden: george.perry@ag.tamu.edu
Diterima: 4 Mei 2023. Diterima: 18 Juli 2023.
Dukungan finansial: Proyek ini sebagian didanai oleh proyek Multistate Hatch 9835. Konflik kepentingan: Penulis tidak memiliki konflik kepentingan untuk diungkapkan.

Hak Cipta © Penulis. Ini adalah artikel Akses Terbuka yang didistribusikan berdasarkan ketentuan Lisensi Atribusi Creative Commons, yang mengizinkan penggunaan, distribusi, dan reproduksi tanpa batas dalam media apa pun, asalkan karya asli dikutip dengan benar.

Estradiol disintesis dalam folikel ovarium sapi di bawah regulasi gonadotropin, dijelaskan oleh model gonadotropin dua sel-dua (Fortune dan Quirk, 1988). Estradiol praovulasi memiliki beberapa peran fisiologis dalam pembentukan kehamilan, termasuk ekspresi estrus (Coe dan Allrich, 1989), menginduksi lonjakan gonadotropin praovulasi (Chenault et al., 1975), memfasilitasi pengangkutan sperma (Hawk dan Cooper, 1975) , dan menginduksi reseptor progesteron endometrium (Zelinski et al., 1982).

Peran estradiol dalam mengatur kesuburan

Estrus

Estrus mengacu pada periode waktu ketika seorang wanita menerima secara seksual. Standing estrus mengacu pada respons perilaku seekor betina yang berdiri untuk dipasangi oleh jantan atau betina lainnya. Inisiasi estrus terjadi karena peningkatan konsentrasi estradiol yang bersirkulasi ketika konsentrasi progesteron rendah (Allrich, 1994). Di antara sapi, konsentrasi estradiol mencapai puncaknya sekitar 36 jam sebelum ovulasi (Chenault et al., 1975), dan peningkatan konsentrasi estradiol sebelum ovulasi berkorelasi dengan peningkatan keberhasilan kebuntingan (Perry et al., 2005). Selain itu, ekspresi estrus, jika dibandingkan dengan tanpa ekspresi estrus, mengurangi keguguran dari hari ke 32 hingga hari ke 60 setelah FTAI (Pereira et al., 2014). Meskipun ekspresi estrus berkontribusi terhadap terjadinya kehamilan, belum ada laporan adanya pengulangan ekspresi estrus (Richardson et al., 2016).

saluran telur

Lingkungan oviduktal bersifat unik dan diatur oleh hormon steroid sepanjang siklus estrus. Produksi lipid dan enzim oleh epitel oviduktal meningkat sebagai respons terhadap estradiol (Witkowska, 1979), dan cairan oviduktal selama estrus juga mengandung faktor kapasitasi sperma (Parrish et al., 1989). Mungkin yang paling penting, sekresi glikoprotein oviduktal dimaksimalkan pada saat estrus (Stanke et al., 1974; Malayer et al., 1988) sebagai respons terhadap estradiol yang berasosiasi dengan reseptor stromanya (Nancarrow dan Hill, 1994). Glikoprotein terkait estrus diproduksi oleh daerah ampula dan tanah genting saluran telur sapi (Boice et al., 1990), dan berinteraksi dengan spermatozoa (King dan Killian, 1994) dan oosit (Wegner dan Killian, 1991) sedemikian rupa. yang meningkatkan pembuahan, laju pembelahan, dan pembentukan blastokista dengan cara yang bergantung pada dosis (Hill et al., 1996; Martus et al., 1998). Selain itu, ketika siklik domba betina diovariektomi, produksi glikoprotein terkait estrus dihapuskan, namun pemberian estradiol benzoat (EB) memulihkan produksi glikoprotein terkait estrus (Sutton et al., 1986).

Selain perubahan pada cairan saluran telur, ekspresi gen saluran telur juga berbeda sepanjang siklus estrus, sehingga ekspresi 37 gen yang terkait dengan sekresi dan modifikasi protein diregulasi selama estrus dibandingkan dengan diestrus pada saluran telur sapi dara (Bauersachs et al., 2003) . Lebih khusus lagi, ekspresi mRNA Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 (MPGES-1), anggota keluarga prostaglandin yang dikenal untuk regulasi ovulasi, pembuahan, dan implantasi (Lim et al., 1997) serta kontraksi saluran telur (Wijayagunawardane et al., 2001), lebih besar pada periode dominasi estrogen dibandingkan dengan dominasi progesteron di seluruh wilayah saluran telur sapi (Gauvreau et al., 2010). Selain itu, hilangnya reseptor estrogen oviduktal meningkatkan aktivitas protease, yang kemudian mengakibatkan kematian embrio dalam dua hari pertama kehamilan (Winuthayanon et al., 2015).

Konsentrasi estradiol pada FTAI berdampak pada ekspresi gen oviduktal, sehingga 1386 dan 61 gen masing-masing berregulasi ke atas dan ke bawah pada sambungan ampullary-isthmic, sementara 349 dan 202 gen masing-masing berregulasi ke atas dan ke bawah di tanah genting. sapi dengan peningkatan konsentrasi estradiol yang bersirkulasi (Quail et al., 2021). Lebih khusus lagi, jalur KEGG yang terkait dengan metabolisme dan pensinyalan hormon dikaitkan dengan peningkatan regulasi gen pada persimpangan ampullary-isthmus, sedangkan peningkatan gen dalam tanah genting dikaitkan dengan adhesi sel jalur KEGG pada sapi dengan peningkatan konsentrasi estradiol di FTAI (Quail et al., 2021).

Lingkungan rahim

Estradiol telah dilaporkan memainkan peran penting dalam menentukan waktu penerimaan uterus (Ozturk dan Demir, 2010). Lingkungan rahim diperlukan untuk pembuahan, perkembangan embrio awal, pengenalan kehamilan, serta pemanjangan dan perlekatan konseptus. Selama siklus estrus, perubahan komposisi dan diferensiasi endometrium diatur oleh estradiol, progesteron, dan oksitosin (Spencer dan Bazer, 2004), dan waktu terjadinya perubahan ini sangat penting untuk kelangsungan hidup embrio. Dengan demikian, estradiol memainkan peran penting dalam menentukan waktu penerimaan uterus (Ozturk dan Demir, 2010). Pada sapi, sinkronisasi antara embrio dan rahim harus ± 24 jam (Hasler, 2001).

Ekspresi gen rahim

Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Zelinski dkk. (1982) menyimpulkan bahwa estradiol menginduksi sintesis reseptor estrogen dan progesteron sitoplasma endometrium (Zelinski et al., 1982), yang selanjutnya mendukung penelitian dari (Koligian dan Stormshak, 1977) yang menyimpulkan bahwa progesteron menghambat pengisian kembali reseptor estradiol sitoplasma selama fase luteal di endometrium ovarium. Baru-baru ini, telah dilaporkan bahwa reseptor progesteron di epitel kelenjar dalam, serta reseptor estradiol endometrium (ERα) mRNA, mengalami peningkatan regulasi pada hari ke 15,5 pada sapi dengan peningkatan konsentrasi estradiol praovulasi (Bridges et al., 2012).

Perbedaan juga terdapat pada ekspresi gen endometrium dan korpus luteum (CL) antara wanita estrus dan non-estrus, dengan transkrip endometrium terkait dengan sintesis prostaglandin (OTR dan COX-2) serta sistem kekebalan dan adhesi sel (CXCL10, IGLL1, MX1, MX2 , MMP19, MYL12A, dan SLPI) dipengaruhi oleh ekspresi estrus (Davoodi et al., 2016). Selain itu, banyaknya transporter glukosa yang bersifat fasilitatif dan bergantung pada natrium, yang bertanggung jawab untuk mengubah komposisi cairan luminal uterus (ULF) dan menyediakan glukosa untuk konseptus yang sedang berkembang, dipengaruhi oleh estradiol, sehingga wanita dengan konsentrasi estradiol praovulasi yang tinggi memiliki peningkatan konsentrasi estradiol praovulasi. kelimpahan SLC2A1 dan SLC5A1 yang lebih besar di jaringan intercaruncular dan caruncular (Northrop et al., 2018).

Superfamili TGF-β terlibat dalam perubahan endometrium, perkembangan plasenta, dan pemeliharaan kehamilan (Jones et al., 2006). Pada saat estrus, terdapat juga peningkatan regulasi beberapa gen yang terlibat dalam remodeling matriks ekstraseluler (Bauersachs et al., 2005), serta perubahan ekspresi subunit inhibin A (anggota jalur pensinyalan TGF-β) di jalur pensinyalan TGF-β. daerah intercaruncular sapi, menunjukkan keterlibatan estradiol dalam mengoordinasikan remodeling endometrium (Ishiwata et al., 2003). Protein susu (SERPINA14) diekspresikan dalam endometrium ruminansia selama kehamilan, dan kemungkinan besar terlibat dalam nutrisi embrio/janin, pertumbuhan embrio/janin, dan penekanan sistem kekebalan ibu (Ing dan Roberts, 1989). Ekspresi SERPINA14, sebagaimana ditentukan oleh RT-PCR Real-time, paling besar pada hari estrus, dan juga diatur setelah stimulasi dengan estradiol. Lebih lanjut, deteksi protein SERPINA14 mengungkapkan bahwa protein tersebut terlokalisasi pada epitel kelenjar dan meningkat pada hari estrus (Ulbrich et al., 2009). Hal ini menunjukkan kemungkinan peran persiapan estradiol praovulasi dalam membangun lingkungan rahim yang kondusif untuk kehamilan.

Gen JAM mengatur osilasi biologis dan transkripsi gen lain dengan cara spesifik jaringan sebagai respons terhadap perubahan status nutrisi, panjang hari, dan kemungkinan pengaruh lingkungan lainnya (Albrecht, 2006). Penurunan ukuran anak, frekuensi perkawinan yang sukses lebih rendah, dan peningkatan panjang siklus telah dilaporkan pada tikus betina ClockΔ19 (tikus yang CLOCK tidak berfungsi) (Chappell et al., 2003). Ketika tikus betina ClockΔ19 diberi perlakuan hormonal untuk menginduksi ovulasi dan dikawinkan dengan tikus jantan subur, tikus betina ClockΔ19 menghasilkan lebih sedikit embrio dibandingkan betina kontrol (Kennaway, 2005). Dari hasil tersebut, ada kemungkinan bahwa cacat gen jam sirkadian di tingkat rahim dapat mengganggu sinkronisasi antara lingkungan rahim dan embrio yang sedang berkembang. Dia dkk. (2007) melaporkan bahwa mRNA Periode 1 (bagian dari loop umpan balik positif CLOCK) diekspresikan dalam rahim tikus diestrus, dan baik estradiol maupun progesteron menstimulasi ekspresi mRNA Periode 1 rahim pada tikus yang diovariektomi. Lebih lanjut, Nakamura dkk. (2005) melaporkan bahwa estradiol mengubah ritme sirkadian normal di rahim. Oleh karena itu, gen jam sirkadian dapat mempengaruhi kesuburan pada tingkat rahim.

PH rahim

Pada betina estrus, terjadi penurunan pH uterus sementara dari 36 jam sebelum timbulnya estrus hingga estrus. Dari permulaan estrus hingga kira-kira 6 jam setelah permulaan estrus, pH uterus meningkat dengan cepat. Baik penurunan pH uterus sebelum estrus maupun peningkatan pH setelah estrus tidak diamati pada betina yang tidak menunjukkan estrus (Perry dan Perry, 2008a). Secara keseluruhan, betina yang berestrus mengalami penurunan pH uterus (pH = 6,72) dibandingkan betina yang tidak berestrus (pH = 7,0). Efek estradiol praovulasi pada pH uterus dievaluasi pada wanita yang diberi atau tidak diobati dengan 1 mg estradiol cypionate (ECP) 36 jam sebelum pemberian akhir GnRH dalam protokol CO-Synch. Wanita yang tidak menstruasi yang tidak menerima ECP memiliki pH uterus yang meningkat (7,0 ± 0,07) dibandingkan dengan wanita estrus yang tidak diberikan ECP (pH = 6,72 ± 0,10; P = 0,02) dan wanita yang tidak menstruasi yang diberikan ECP (6,81 ± 0,09; P = 0,06;Perry dan Perry, 2008b). Bolzenius dkk. (2016) melaporkan bahwa ketika pH uterus menurun pada saat FTAI, angka kehamilan meningkat. Mereka juga mencatat bahwa isoform penukar NA+/H+ 1, 2, dan 3 berperan dalam mengubah pH uterus selama permulaan estrus (Bolzenius et al., 2016). Mengingat Jones dan Bavister (2000) melaporkan bahwa ketika pH menurun, motilitas sperma sapi jantan menurun dan umur panjang meningkat, perubahan sementara pada pH uterus di sekitar estrus dapat memberikan mekanisme untuk meningkatkan umur sperma di saluran reproduksi.

Hawk (1983) melaporkan bahwa agar sperma dapat diangkut secara efisien di saluran reproduksi wanita, wanita memerlukan paparan estradiol. Pada awal estrus, pH uterus menurun yang mungkin menyebabkan sperma lebih panjang umurnya melalui penurunan motilitas sementara (Wong et al., 1981). Puncak pH uterus yang diamati 6 jam setelah estrus mungkin berperan dalam membantu transportasi sperma, sebagaimana dilaporkan oleh Goltz dkk., (1988) seiring dengan peningkatan pH, demikian pula motilitas sperma (Goltz dkk., 1988). Sapi yang mengalami standing estrus mengalami penurunan pH uterus (6,78) dan meningkatkan keberhasilan kebuntingan (52%) dibandingkan dengan sapi yang tidak memulai standing estrus, namun diinduksi untuk berovulasi (masing-masing 6,96 dan 38%). Peningkatan keberhasilan kebuntingan pada sapi yang menunjukkan estrus berdiri kemungkinan besar disebabkan oleh peningkatan transportasi sperma ke tempat pembuahan (Larimore et al., 2015). Dalam skenario FTAI, pemberian GnRH yang kedua dapat menginduksi ovulasi sekitar 30 jam setelah pemberian tanpa adanya peningkatan konsentrasi estradiol (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999), dan kelangsungan hidup sperma hingga ovulasi dapat terganggu. interval dari inseminasi hingga ovulasi diperpanjang.

Pemupukan

Sebuah tinjauan oleh Santos dkk. (2004) melaporkan kegagalan pembuahan pada sapi potong dan sapi perah laktasi mencapai 45%. Sebuah studi pada sapi potong, dimana embrio dikeluarkan dari sapi dengan konsentrasi estradiol tinggi atau rendah pada saat FTAI, mengungkapkan bahwa sapi dengan konsentrasi estradiol lebih besar pada ovulasi yang diinduksi GnRH lebih mungkin menghasilkan embrio yang telah dibuahi dibandingkan dengan oosit yang tidak dibuahi (Jinks dkk., 2013). Selain itu, hewan yang menunjukkan estrus sebelum FTAI mengalami peningkatan jumlah sperma tambahan dan peningkatan kualitas embrio dibandingkan dengan hewan yang tidak menunjukkan estrus (Larimore et al., 2015). Meskipun sperma aksesori tidak terlibat dalam pembuahan, sperma tersebut mewakili sperma yang mampu mengakses saluran telur, menjalani kapasitasi dan reaksi akrosom, mengenali dan berikatan dengan oosit, dan sebagian menembus zona pelusida (Dalton et al., 2006). Jumlah sperma tambahan yang terperangkap di zona pelusida berhubungan positif dengan kesuburan (Hunter dan Wilmut, 1984; Hawk dan Tanabe, 1986; DeJarnette dkk., 1992; Nadir dkk., 1993), dan dianggap sebagai faktor penentu kesuburan. ukuran tidak langsung dari transportasi sperma dan ketersediaan sperma kompeten yang bersaing untuk pembuahan (DeJarnette et al., 1992).

Aliran darah rahim

Faktor endokrin, parakrin, dan autokrin semuanya terlibat dalam perkembangan dan pertumbuhan embrio dan plasenta. Janin sapi menerima nutrisi melalui hematotrof dan histotrof. Hematotrof memungkinkan pertukaran nutrisi antara janin dan ibu

sirkulasi (Bazer et al., 1990). Ketika ultrasonografi doppler transrektal digunakan untuk mengkarakterisasi aliran darah uterus, konsentrasi estradiol yang bersirkulasi ditentukan paling tinggi pada hari ke-2 (hari 0 = ovulasi) dan aliran darah uterus paling tinggi pada hari ke-3 (Bollwein et al., 2000). Demikian pula, korelasi positif antara konsentrasi estradiol yang bersirkulasi dan aliran darah uterus serta diameter arteri uterina ditentukan setelah pemberian EB (10 mg; Rawy et al., 2018). Aliran darah meningkat dua hari sebelum estrus, dan tetap meningkat sampai hari setelah estrus, yang berhubungan dengan peningkatan konsentrasi estradiol (Ford dan Chenault, 1981).

Aliran darah uterus serupa pada sapi bunting dan tidak bunting hingga 13 hari pascakawin, dimana aliran darah ke tanduk gravid meningkat. Pada hari ke 25 hingga hari ke 30, aliran darah meningkat ke tanduk gravid dan menurun ke tanduk nongravid. Konsentrasi progesteron dan aliran darah uterus ke tanduk gravid berkorelasi positif. Peningkatan aliran darah ke tanduk gravid, yang disebabkan oleh konseptus praimplantasi, serupa dengan aliran darah yang diamati ketika estradiol meningkat (Ford dan Chenault, 1981). Peningkatan aliran darah juga dapat meningkatkan aliran darah ke CL yang terdapat pada ovarium ipsilateral, sehingga meningkatkan sekresi progesteron yang akan membantu mempertahankan kehamilan (Ford dan Chenault, 1981).

Ketebalan endometrium rahim

Sugiura dkk. (2018) melaporkan bahwa ketika konsentrasi progesteron menurun, ketebalan endometrium meningkat; namun, estradiol juga dapat berperan dalam mempertahankan dan/atau meningkatkan perubahan ini, karena ketebalan endometrium berkorelasi kuat dengan rasio Estradiol:Progesteron setelah estrus alami dan terinduksi (Sugiura et al., 2018). Ketebalan endometrium diukur dengan ultrasonografi transrektal pada sapi Holstein menyusui yang diberikan protokol Ovsynch. Ketebalan endometrium meningkat dari 7 menjadi 9,5 mm setelah pemberian prostaglandin, tetap tebal (> 9 mm) selama dua hari, dan kemudian menjadi lebih tipis pada hari 1 (8 mm) dan 2 (7,4 mm) setelah pemberian GnRH kedua. Pemberian suplemen estradiol-17β (1mg) delapan jam sebelum pemberian GnRH yang kedua meningkatkan kehamilan akibat AI pada wanita dengan endometrium yang lebih tipis. Namun, pada wanita yang memiliki ketebalan endometrium > 8 mm 48 jam setelah pemberian prostaglandin, suplementasi estradiol tidak memperbaiki kehamilan akibat AI (Souza et al., 2011).

Histotrof

Histotrof uterus terdiri dari nutrisi, faktor pertumbuhan, protein, glukosa, agen imunosupresif, enzim, dan ion. Hal ini disekresi oleh endometrium dan diperlukan untuk pertumbuhan/kelangsungan hidup konseptus awal (Geisert et al., 1992; Gray et al., 2001). Perubahan apa pun dapat sangat mempengaruhi kelangsungan hidup embrio awal. Secara khusus, glukosa merupakan sumber bahan bakar utama yang digunakan oleh konsepsi untuk pertumbuhan dan perkembangan. Hewan yang menunjukkan estrus selama protokol FTAI memiliki konsentrasi glukosa yang lebih besar di ULF dibandingkan dengan hewan yang tidak mengalami menstruasi (Northrop et al., 2018). Ketika pemberian estrogen, sesuai dengan inisiasi estrus, dihilangkan pada domba betina yang diovariektomi dan diberi suplemen hormon, kelangsungan hidup embrio setelah transfer embrio (Miller dan Moore, 1976), berat uterus, protein uterus, rasio RNA terhadap DNA, dan laju produksi protein. sintesis menurun (Miller et al., 1977).

Secara keseluruhan, sapi yang menunjukkan estrus berdiri sekitar waktu FTAI mengalami peningkatan konsentrasi estradiol sebelum ovulasi (Perry et al., 2005; Perry dan Perry, 2008a; Perry dan Perry, 2008b), penurunan pH uterus (Perry dan Perry, 2008a; Perry dan Perry, 2008b), meningkatkan transportasi sperma (Larimore et al., 2015), dan meningkatkan keberhasilan kebuntingan (Perry et al., 2005) dibandingkan dengan sapi yang tidak mengalami menstruasi. Akibatnya, konsentrasi estradiol sebelum ovulasi mungkin memainkan peran utama dalam lingkungan rahim serta pembentukan dan pemeliharaan kehamilan.

Efek progesteron selanjutnya

Dua faktor terpenting yang terlibat dalam terjadinya kehamilan adalah konsentrasi estradiol yang bersirkulasi sebelum ovulasi yang diinduksi GnRH dan konsentrasi progesteron yang bersirkulasi pada hari ke 7 setelah ovulasi (Atkins et al., 2013; Jinks et al., 2013). Namun, sapi dengan konsentrasi estradiol yang lebih besar pada saat ovulasi yang diinduksi GnRH juga memiliki ukuran folikel dominan yang lebih besar dan konsentrasi progesteron yang bersirkulasi lebih besar pada hari ke 7 (Jinks et al., 2013). Di antara sapi perah, sapi yang berovulasi folikel kecil (10 hingga 15 mm) mengalami penurunan konsentrasi progesteron pada hari ke 7 (Sartori et al., 2006) dan sapi yang diberi AI dengan penurunan konsentrasi progesteron pada hari ke 7 mengalami penurunan P/AI, namun ketika embrio ditransfer tidak ada hubungan antara konsentrasi progesteron dan P/ET (Sartori et al., 2006; Demetrio et al., 2007). Oleh karena itu, dampak langsung peningkatan estradiol praovulasi kemungkinan besar terjadi pada oosit selama maturasi akhir atau pada awal perkembangan embrio sebelum hari ke 7.

Lingkungan folikular praovulasi penting untuk mempersiapkan sel-sel folikular untuk luteinisasi dan sekresi progesteron (McNatty et al., 1975). McNatty dkk. (1979) menyatakan bahwa perkembangan CL normal bergantung pada folikel yang memenuhi kriteria berikut: 1) jumlah sel granulosa yang memadai, 2) jumlah reseptor hormon luteinizing (LH) yang memadai pada sel granulosa dan sel teka, dan 3) sel granulosa yang mampu mensintesis progesteron dalam jumlah yang cukup setelah luteinisasi. Di dalam sel granulosa, estradiol dilaporkan menyebabkan: 1) peningkatan proliferasi sel (Goldenberg et al., 1972; Parrott dan Skinner, 1998; Dupont et al., 2000), 2) pembentukan gap persimpangan (Merk et al., 1972 ; Burghardt dan Anderson, 1981), 3) peningkatan aksi stimulasi hormon perangsang folikel (FSH) pada aktivitas aromatase (Adashi dan Hsueh, 1982; Zhuang et al., 1982; Reilly et al., 1996), 4) peningkatan stimulasi sintesis progesteron setelah stimulasi gonadotropin (Welsh et al., 1983; Fanjul et al., 1984), dan 5) peningkatan perolehan reseptor LH (Kessel et al., 1985; Farookhi dan Desjardins, 1986; Wang dan Greenwald, 1993) . Lebih lanjut, sel granulosa yang diluteinisasi mengeluarkan peningkatan progesteron ketika dikumpulkan dari folikel yang memiliki konsentrasi estradiol yang meningkat dibandingkan dengan sel granulosa dari folikel yang mengalami penurunan konsentrasi estradiol (McNatty et al., 1979).

Hubungan antara keberhasilan kebuntingan dan konsentrasi progesteron yang bersirkulasi selama awal kebuntingan pada sapi masih samar-samar, karena sekresi progesteron luteal diperlukan untuk kelangsungan hidup embrio/janin (McDonald et al., 1952). Beberapa penelitian telah melaporkan peningkatan konsentrasi progesteron pada sapi bunting dibandingkan dengan sapi tidak bunting yang dimulai sejak hari ke-4 (Butler et al., 1996) atau hari ke-6 (Henricks et al., 1971; Erb et al., 1976) setelah inseminasi. Selain itu, sapi yang mengalami peningkatan progesteron lebih awal memiliki embrio yang perkembangannya lebih maju, menghasilkan lebih banyak interferon τ (INF-τ), dan mampu menghambat prostaglandin $F_{2\alpha}$pelepasan pada hari ke 16 setelah berkembang biak (Kerbler et al., 1997; Mann et al., 1998; Mann dan Lamming, 2001). Demikian pula, sapi yang diberi suplementasi progesteron selama awal kehamilan mempunyai ekspresi endometrium tingkat lanjut dari beberapa gen yang terkait dengan sekresi uterus dan perkembangan konseptus (Forde et al., 2009; Forde et al., 2010). Ada spekulasi bahwa progesteron menginduksi perubahan ekspresi gen endometrium, yang menyebabkan perubahan komposisi histotrof uterus (Spencer et al., 2008). Bartol dkk. (1981) menetapkan bahwa akumulasi protein dalam lumen uterus berhubungan dengan durasi stimulasi progesteron. Namun, suplementasi langsung progesteron setelah inseminasi memberikan hasil yang berbeda-beda. Beberapa penelitian telah melaporkan peningkatan P/AI sebesar 10 hingga 60% setelah suplementasi progesteron (Robinson et al., 1989; Macmillan dan Peterson, 1993), namun penelitian lainnya menggunakan domba (Diskin dan Niswender, 1989; Nephew et al., 1994) dan sapi (Walton et al., 1990; Van Cleeff et al., 1991; Monteiro et al., 2015) melaporkan tidak ada manfaat atau bahkan penurunan P/ET (Monteiro et al., 2015) suplementasi progesteron terhadap keberhasilan kehamilan.

Atkins dkk. (2013) melaporkan bahwa konsentrasi estradiol pada ovulasi yang diinduksi GnRH (hari ke-0) mempengaruhi P/ET sapi penerima pada hari ke-27, terlepas dari konsentrasi progesteron pada hari ke-7. Selain itu, penelitian dari laboratorium kami telah melaporkan bahwa ketika ukuran folikel ovulasi dikontrol, terdapat Tidak ada perbedaan pada berat CL hari ke 10, konsentrasi progesteron dalam sirkulasi, atau ekspresi enzim steroidogenik luteal antara sapi yang menunjukkan status berdiri.

estrus dan sapi non-strual (Fields et al., 2012). Konsentrasi progesteron plasma pada hari ke 7 (hari ke 0 = induksi ovulasi) dapat berhubungan positif dengan kemungkinan kehamilan hanya jika konsentrasi estradiol praovulasi rendah. Hubungan antara konsentrasi progesteron plasma pada hari ke 7 dan kehamilan tidak diamati ketika konsentrasi estradiol praovulasi tinggi (Ciernia et al., 2021). Menariknya, pada hari ke 17, sapi bunting dilaporkan memiliki konsentrasi progesteron lebih besar dibandingkan sapi tidak bunting ketika sapi betina mengalami: 1) penurunan estradiol praovulasi dan penurunan progesteron berikutnya, 2) penurunan estradiol praovulasi dan progesteron berikutnya normal, atau 3) peningkatan estradiol praovulasi dan penurunan progesteron berikutnya. Namun, pada sapi yang tergolong mengalami peningkatan estradiol praovulasi dan progesteron berikutnya yang normal, konsentrasi progesteron pada hari ke 17 tidak berbeda antara sapi bunting dan tidak bunting (Ciernia et al., 2021). Oleh karena itu, peningkatan keberhasilan kebuntingan pada sapi dengan peningkatan konsentrasi estradiol praovulasi kemungkinan besar tidak bergantung pada dampak progesteron terhadap lingkungan uterus selama siklus estrus berikutnya.

Perkembangan dan kelangsungan hidup embrio awal

Ketika pemberian estrogen, bersamaan dengan inisiasi estrus, dihilangkan pada domba betina yang diovariektomi dan diberi suplemen hormon, kelangsungan hidup embrio setelah transfer embrio menurun (Miller dan Moore, 1976). Dalam penelitian terbaru di laboratorium kami, sapi yang diovariektomi menerima hormon eksogen untuk meniru fase luteal dan luteolisis, dan kemudian menerima ECP, EB, atau tanpa pengobatan (CON) untuk meniru periode praovulasi. Ovulasi dirangsang dengan pemberian GnRH (100 µg; hari 0), dan embrio dipindahkan pada hari ke 7. Sapi yang menerima paparan estradiol praovulasi (ECP atau EB) memiliki pembentukan kebuntingan dan kelangsungan hidup embrio yang lebih besar dibandingkan dengan hewan yang tidak menerima paparan estradiol praovulasi (4%, 29%, dan 21% untuk CON, EB, dan ECP, masing-masing; (Madsen et al., 2015). Selain itu, estradiol praovulasi dilaporkan mempunyai dampak positif terhadap perkembangan konsepsi, sehingga sapi yang menunjukkan estrus memiliki peningkatan panjang konsepsi dibandingkan dengan sapi yang tidak menstruasi pada hari ke 19 kebuntingan (Davoodi et al., 2016). Karena konseptus yang lebih besar akan menempati ruang lumen yang lebih besar, ekspresi gen yang distimulasi INF-τ dapat ditingkatkan, yang mungkin bermanfaat bagi kehamilan .Selanjutnya, pada konseptus betina hari ke 19 yang mengekspresikan estrus, terdapat empat gen yang diekspresikan secara berbeda (*ISG15*,*PLAU*, *BMP15*, Dan*EEF1A1*; Davoodi dkk., 2016). Hasil ini menunjukkan bahwa perubahan ekspresi gen reproduksi sekitar periode praimplantasi menguntungkan terhadap pemanjangan konseptus mengingat ekspresi estrus dekat FTAI.

Kesimpulan

Studi-studi ini menunjukkan tidak hanya pentingnya terjadinya dan waktu peningkatan konsentrasi estradiol praovulasi, tetapi juga bahwa peningkatan konsentrasi estradiol melalui suplementasi mungkin tidak cukup untuk meningkatkan kesuburan. Peningkatan produksi estradiol oleh folikel praovulasi mungkin diperlukan untuk meningkatkan kesuburan melalui pengaturan transportasi sperma, pembuahan, sekresi saluran telur, lingkungan rahim, dan kelangsungan hidup embrio.

Ucapan Terima Kasih

Pekerjaan ini sebagian didanai oleh Multistate Hatch (proyek 9835).

Referensi

Adashi EY, Hsueh AJ. Estrogen meningkatkan stimulasi aktivitas aromatase ovarium oleh folikel-hormon perangsang dalam sel granulosa tikus yang dikultur. J Biol Kimia. 1982;257(11):6077-83. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(20)65107-9. PM Tengah:6804461.

Albrecht U. Orkestrasi ekspresi gen dan fisiologi berdasarkan jam sirkadian. J Fisiol Paris. 2006;100(5-6):243-51. http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2007.05.004. PM Tengah:17643274.

Allrich RD. Kontrol endokrin dan saraf estrus pada sapi perah. J Ilmu Susu. 1994;77(9):2738-44. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77216-7. PM Tengah:7814742.

Atkins JA, Smith MF, MacNeil MD, Jinks EM, Abreu FM, Alexander LJ, Geary TW. Pembentukan kehamilan dan pemeliharaan pada ternak. J Anim Sains. 2013;91(2):722-33. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2012-5368. PM Tengah:23148248.

Bartol FF, Thatcher WW, Lewis GS, Bliss EL, Drost M, Bazer FW. Pengaruh estradiol-17beta pada PGF dan kandungan protein total dalam pembilasan rahim sapi dan konsentrasi plasma perifer 13, 14-dihydro-15-keto-PGF(2alpha). Teriogenologi. 1981;15(4):345-58. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(81)90002-9. PM Tengah:16725594.

Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NA, Berber RA, Valentim R, Carvalho AFD Fo, Costa WP No. Follicular dinamika dan tingkat kehamilan pada penerima embrio (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus) yang diobati dengan protokol "Ovsynch" untuk transfer embrio waktu tetap. Braz J Dokter Hewan Res Anim Sci. 2003;40:96-106. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962003000800003.

Bauersachs S, Blum H, Mallok S, Wenigerkind H, Rief S, Prelle K, Wolf E. Regulasi ipsilateral dan fungsi sel epitel saluran telur sapi kontralateral pada periode pascaovulasi: pendekatan transkriptomik. Reproduksi Biol. 2003;68(4):1170-7. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.102.010660. PM Tengah:12606461.

Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Einspanier R, Wenigerkind H, Vermehren M, Blum H, Sinowatz F, Wolf E. Profil ekspresi gen endometrium sapi selama siklus estrus: deteksi jalur molekuler yang terlibat dalam perubahan fungsional. J Mol Endokrinol. 2005;34(3):889-908. http://dx.doi.org/10.1677/jme.1.01799. PM Tengah:15956356.

Bazer FW, Terqui M, Martinat-Butte F. Batasan fisiologis reproduksi. Dalam: Prosiding ke-4 Kongres Dunia tentang Genetika yang Diterapkan pada Produksi Ternak; 1990 23-27 Juli, Edinburgh, Skotlandia. Edinburgh: Universitas Edinburgh; 1990. hal. 292-8.

Bó GA, Cedeño A. Ekspresi estrus sebagai faktor yang relevan dalam program transfer embrio waktu tetap menggunakan protokol berbasis estradiol/progesteron pada sapi. Reprod Anim. 2018;15(3):224-30. http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0060. PM Tengah:34178145.

Boice ML, Geisert RD, Blair RM, Verhage HG. Identifikasi dan karakterisasi saluran telur sapi glikoprotein yang disintesis saat estrus. Reproduksi Biol. 1990;43(3):457-65. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod43.3.457. PM Tengah:2271726.

Bollwein H, Meyer HH, Maierl J, Weber F, Baumgartner U, Stolla R. Sonografi doppler transrektal dari aliran darah uterus pada sapi selama siklus estrus. Teriogenologi. 2000;53(8):1541-52. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00296-X. PM Tengah:10883842.

Bolzenius JK, Cushman RA, Perry GA. Ekspresi isoform penukar Na(+)/H(+) 1, 2, 3, dan 4 pada sapi endometrium dan pengaruh pH uterus pada waktu AI yang tetap terhadap keberhasilan kehamilan. Ilmu Reproduksi Anim. 2016;171:98-107. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.06.004. PM Tengah:27338797.

Jembatan GA, Mussard ML, Pate JL, Ott TL, Hansen TR, Day ML. Dampak estradiol praovulasi konsentrasi pada perkembangan konseptus dan ekspresi gen uterus. Ilmu Reproduksi Anim. 2012;133(1-2):16-26. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.013. PM Tengah:22789700.

Burghardt RC, Anderson E. Modulasi hormonal persimpangan celah pada folikel ovarium tikus. Res Jaringan Sel. 1981;214(1):181-93. http://dx.doi.org/10.1007/BF00235155. PM Tengah:7471172.

Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Nitrogen urea plasma dan susu dalam kaitannya dengan tingkat kehamilan pada menyusui sapi perah. J Anim Sains. 1996;74(4):858-65. http://dx.doi.org/10.2527/1996.744858x. PM Tengah:8728008.

Chappell PE, RS Putih, Mellon PL. Ekspresi gen sirkadian mengatur pelepasan gonadotropin secara pulsatil pola sekresi hormon (GnRH) dalam garis sel GT1-7 yang mensekresi GnRH hipotalamus. J Ilmu Saraf. 2003;23(35):11202-13. http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-35-11202.2003. PM Tengah:14657179.

Chenault JR, Thatcher WW, Kalra PS, Abrams RM, Wilcox CJ. Perubahan sementara pada progestin plasma, estradiol, dan hormon luteinizing mendekati ovulasi pada sapi. J Ilmu Susu. 1975;58(5):709-17.http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84632-7. PM Tengah: 1170219.

Ciernia LA, Perry GA, Smith MF, Rich JJ, Northrop EJ, Perkins SD, Green JA, Zezeski AL, Geary TW. Efek dari estradiol sebelum dan progesteron setelah ovulasi pada proporsi sapi potong pasca melahirkan yang bunting. Ilmu Reproduksi Anim. 2021;227:106723. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106723. PM Tengah:33621845.

Coe BL, Allrich RD. Hubungan antara estradiol-17 beta endogen dan perilaku estrus pada sapi dara. J Sains Animasi. 1989;67(6):1546-51. http://dx.doi.org/10.2527/jas1989.6761546x. PM Tengah:2768112.

Dalton JC, Nadir S, Noftsinger M, Bame J, Saacke RG. Faktor penatalaksanaan berhubungan dengan kesuburan pria. Dalam: Strategi Reproduksi Terapan pada Sapi Potong; 2006; Rapid City, Amerika Serikat. 2006. hal. 279-290.

Davoodi S, Cooke RF, Fernandes AC, Cappellozza BI, Vasconcelos JL, Cerri RL. Ekspresi estrus memodifikasi profil ekspresi gen dalam jaringan reproduksi pada hari ke 19 kehamilan pada sapi potong. Teriogenologi. 2016;85(4):645-55. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.002. PM Tengah:26525398.

DeJarnette JM, Saacke RG, Bame J, Vogler CJ. Sperma aksesori: pentingnya bagi kesuburan dan embrio kualitas, dan upaya untuk mengubah jumlah mereka pada sapi yang diinseminasi buatan. J Anim Sains. 1992;70(2):484-91. http://dx.doi.org/10.2527/1992.702484x. PM Tengah:1548211.

Demetrio DG, Santos RM, Demetrio CG, Vasconcelos JL. Faktor-faktor yang mempengaruhi angka konsepsi berikut ini inseminasi buatan atau transfer embrio pada sapi Holstein menyusui. J Ilmu Susu. 2007;90(11):5073-82. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0223. PM Tengah:17954747.

Diskin MG, Niswender GD. Pengaruh suplementasi progesteron pada kehamilan dan kelangsungan hidup embrio di domba betina. J Anim Sains. 1989;67(6):1559-63. http://dx.doi.org/10.2527/jas1989.6761559x. PM Tengah:2768114.

Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Pengaruh tunggal dan majemuk KO reseptor estrogen alfa (ERalpha) dan beta (ERbeta) pada fenotip reproduksi tikus. Perkembangan. 2000;127(19):4277-91. http://dx.doi.org/10.1242/dev.127.19.4277. PM Tengah:10976058.

Erb RE, Garverick HA, Randel RD, Brown BL, Callahan CJ. Profil hormon reproduksi terkait dengan inseminasi subur dan nonfertil pada sapi perah. Teriogenologi. 1976;5(5):227-42. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(76)90235-1. PM Tengah:976584.

Fanjul LF, Ruiz de Galarreta CM, Hsueh AJ. Regulasi estrogen dari enzim biosintetik progestin di sel granulosa tikus yang dikultur. Reproduksi Biol. 1984;30(4):903-12. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod30.4.903. PM Tengah:6428475.

Farookhi R, Desjardins J. Induksi reseptor hormon luteinisasi dalam sel granulosa terdispersi membutuhkan estrogen. Endokrinol Sel Mol. 1986;47(1-2):13-24. http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207(86)90011-0. PM Tengah:3017785.

Bidang SD, Gebhart KL, Perry BL, Gonda MG, Wright CL, Bott RC, Perry GA. Pengaruh standing estrus sebelum injeksi GnRH selama protokol AI waktu tetap sapi potong pada pelepasan LH, konsentrasi progesteron selanjutnya, dan ekspresi enzim steriodogenik. Endokrinol Anim Domestik. 2012;42(1):11-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.08.002. PM pertengahan:22019093.

Ford SP, Chenault JR. Darah mengalir ke ovarium yang mengandung korpus luteum dan tanduk uterus ipsilateral selama siklus estrus dan awal kehamilan. J Reproduksi Subur. 1981;62(2):555-62. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0620555. PM Tengah:7252931.

Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Penyendiri P, Roche JF. Perubahan ekspresi gen endometrium yang diatur oleh progesteron berkontribusi terhadap perkembangan konsepsi tingkat lanjut pada sapi. Reproduksi Biol. 2009;81(4):784-94. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.074336. PM pertengahan:19553605.

Forde N, Spencer TE, Bazer FW, Song G, Roche JF, Lonergan P. Pengaruh kehamilan dan progesteron konsentrasi pada ekspresi gen yang mengkode transporter atau protein yang disekresikan dalam endometrium sapi. Genomik Fisiol. 2010;41(1):53-62. http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00162.2009. PM Pertengahan:19996158.

Keberuntungan JE, Keunikan SM. Regulasi steroidogensis pada folikel praovulasi sapi. J Anim Sains. 1988;66(Tambahan 2):1-8.

Gauvreau D, Moisan V, Roy M, Fortier MA, Bilodeau JF. Ekspresi sintase prostaglandin E di saluran telur sapi. Teriogenologi. 2010;73(1):103-11. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.006. PM Pertengahan:19875162.

Geisert RD, Morgan GL, Pendek EC Jr, Zavy MT. Peristiwa endokrin terkait dengan fungsi endometrium dan perkembangan konsepsi pada sapi. Reproduksi Fertil Dev. 1992;4(3):301-5. http://dx.doi.org/10.1071/RD9920301. PM Tengah:1438962.

Goldenberg RL, Bridson WE, Kohler PO. Stimulasi estrogen sintesis progesteron oleh babi sel granulosa dalam kultur. Biokimia Biophys Res Commun. 1972;48(1):101-7. http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(72)90349-X. PM Tengah:5041869.

Goltz JS, Gardner TK, Kanous KS, Lindemann CB. Interaksi pH dan siklik adenosin 3′,5′-monofosfat pada aktivasi motilitas pada sperma banteng yang diekstraksi Triton X-100. Reproduksi Biol. 1988;39(5):1129-36. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod39.5.1129. PM Tengah:2851335.

Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, Spencer TE. Kelenjar endometrium diperlukan untuk pemanjangan konseptus praimplantasi dan kelangsungan hidup. Reproduksi Biol. 2001;64(6):1608-13. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1608. PM Tengah:11369585.

Hasler JF. Faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat kebuntingan transfer embrio beku dan segar pada sapi. Teriogenologi. 2001;56(9):1401-15. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00643-4. PM Tengah:11768807.

Hasler JF. Empat puluh tahun transfer embrio pada sapi: tinjauan yang berfokus pada jurnal Theriogenology, the pertumbuhan industri di Amerika Utara, dan kenangan pribadi. Teriogenologi. 2014;81(1):152-69.http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010. PM Tengah:24274419.

Elang HW, Cooper BS. Peningkatan transportasi sperma dengan pemberian estradiol ke estrus domba betina. J Anim Sains. 1975;41(5):1400-6. http://dx.doi.org/10.2527/jas1975.4151400x. PM Tengah:1238386.

Elang HW, Tanabe TY. Pengaruh inseminasi kornu unilateral terhadap tingkat pembuahan pada superovulasi dan sapi berovulasi tunggal. J Anim Sains. 1986;63(2):551-60. http://dx.doi.org/10.2527/jas1986.632551x. PM Tengah:3759689.

Elang HW. Kelangsungan hidup dan transportasi sperma di saluran reproduksi wanita. J Ilmu Susu. 1983;66(12):2645-60.http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82138-9. PM Tengah:6365994.

Dia PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hattori MA. Peningkatan regulasi ekspresi Per1 oleh estradiol dan progesteron dalam rahim tikus. J Endokrinol. 2007;194(3):511-9. http://dx.doi.org/10.1677/JOE-07-0172.PMid:17761890.

Henricks DM, Lamond DR, Hill JR, Dickey JF. Konsentrasi progesteron plasma sebelum kawin dan dalam kebuntingan awal pada sapi potong. J Anim Sains. 1971;33(2):450-4. http://dx.doi.org/10.2527/jas1971.332450x. PM Tengah:5570075.

Hill JL, Walker SK, Brown GH, Nancarrow CD. Efek dari glikoprotein oviduktal terkait estrus tentang fertilisasi in vitro dan perkembangan oosit ovine yang matang secara in vitro. Teriogenologi. 1996;46(8):1379-88. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00317-2.

Hunter RH, Wilmut I. Transportasi sperma pada sapi: redistribusi sel-sel yang hidup di dalam peri-ovulasi saluran telur. Reprod Nutr Dev. 1984;24(5A):597-608. http://dx.doi.org/10.1051/rnd:19840508. PM Tengah:6549076.

Ing NH, Roberts RM. Protein utama yang dimodulasi progesteron yang disekresikan ke dalam rahim domba adalah anggota superfamili serpin dari serine protease inhibitor. J Biol Kimia. 1989;264(6):3372-9. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94076-7. PM Tengah:2464597.

Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel OV, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hirasawa A, Shiojima S, Ikawa H, Suzuki Y, Tsujimoto G, Izaike Y, Todoroki J, Hashizume K. Karakterisasi profil ekspresi gen pada awal kehamilan sapi menggunakan microarray cDNA khusus. Pengembang Reprod Mol. 2003;65(1):9-18.http://dx.doi.org/10.1002/mrd.10292. PM Tengah:12658628.

Jinks EM, Smith MF, Atkins JA, Pohler KG, Perry GA, Macneil MD, Roberts AJ, Waterman RC, Alexander LJ, Geary TW. Estradiol praovulasi dan pembentukan serta pemeliharaan kebuntingan pada sapi potong yang disusui. J Anim Sains. 2013;91(3):1176-85. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2012-5611. PM Tengah:23296810.

Jones JM, Bavister BD. Pengasaman pH intraseluler pada spermatozoa sapi menekan motilitas dan memperpanjang umur yang layak. J Androl. 2000;21(5):616-24. PM Tengah:10975407.

Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. Ekspresi dan tindakan superfamili TGF-beta di endometrium dan plasenta. Reproduksi. 2006;132(2):217-32. http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.01076. PM Tengah:16885531.

Kennaway DJ. Peran ritme sirkadian dalam reproduksi. Pembaruan Hum Reprod. 2005;11(1):91-101. http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmh054. PM Tengah:15569698.

Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Hubungan antara plasma ibu konsentrasi progesteron dan sintesis interferon-tau oleh konseptus pada sapi. Teriogenologi. 1997;47(3):703-14. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00028-9. PM Tengah:16728022.

Kessel B, Liu YX, Jia XC, Hsueh AJ. Peran autokrin estrogen dalam augmentasi hormon luteinisasi pembentukan reseptor dalam sel granulosa tikus yang dikultur. Reproduksi Biol. 1985;32(5):1038-50. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod32.5.1038. PM Tengah:2990583.

Raja RS, Killian GJ. Pemurnian protein terkait estrus sapi dan lokalisasi pengikatan sperma. Reproduksi Biol. 1994;51(3):34-42. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod51.3.34. PM Tengah:7803605.

Koligian KB, Stormshak F. Penghambatan progesteron pengisian reseptor estrogen di ovine endometrium. Reproduksi Biol. 1977;17(3):412-6. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod17.3.412. PM Tengah:901893.

Larimore EL, Amundson OL, Bird SL, Funnell BJ, Kruse SG, Bridges GA, Perry GA. Pengaruh estrus pada inseminasi buatan waktu tetap terhadap perkembangan embrio awal pada sapi potong. J Anim Sains. 2015;93(6):2806-12. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2015-8892. PM Tengah:26115268.

Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Reproduksi wanita multipel kegagalan pada tikus yang kekurangan siklooksigenase 2. Sel. 1997;91(2):197-208. http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80402-X. PM Tengah:9346237.

Lohuis M. Potensi manfaat teknologi manipulasi embrio sapi untuk perbaikan genetik program. Teriogenologi. 1995;43(1):51-60. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(94)00016-N.

Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. Hubungan ukuran folikel pra-ovulasi, estradiol konsentrasi dan musim terhadap hasil kebuntingan pada sapi perah. Ilmu Reproduksi Anim. 2007;99(1-2):34-43.http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.056. PM Tengah:16777360.

Macmillan KL, Peterson AJ. Alat pelepas progesteron intervagional baru untuk sapi (CIDR-B) untuk sinkronisasi estrus, meningkatkan angka kehamilan dan pengobatan anestrus pasca melahirkan. Ilmu Reproduksi Anim. 1993;33(1-4):1-25. http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(93)90104-Y.

Madsen CA, Perry GA, Mogck CL, Daly RF, MacNeil MD, Geary TW. Efek estradiol praovulasi pada kelangsungan hidup embrio dan pembentukan kebuntingan pada sapi potong. Ilmu Reproduksi Anim. 2015;158:96-103. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.006. PM Tengah:26022231.

Malayer JR, Hansen PJ, Buhi WC. Sekresi protein oleh saluran telur sapi yang dikultur dikumpulkan dari estrus melalui diestrus awal. J Exp Zool. 1988;248(3):345-53. http://dx.doi.org/10.1002/jez.1402480313. PM Tengah:3209983.

Mann GE, Lamming GE, Fisher PA. Kontrol progesteron terhadap produksi interferon tau embrio selama kehamilan awal pada sapi. J Reproduksi Subur. 1998;21:37.

Mann GE, Lamming GE. Hubungan antara lingkungan endokrin ibu, embrio awal pengembangan dan penghambatan mekanisme luteolitik pada sapi. Reproduksi. 2001;121(1):175-80. http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1210175. PM Tengah:11226041.

Martus NS, Verhage HG, Mavrogianis PA, Thibodeaux JK. Peningkatan fertilisasi oosit sapi di vitro dengan glikoprotein spesifik oviduk sapi. J Reproduksi Subur. 1998;113(2):323-9. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1130323. PM Tengah:9861173.

McDonald LE, Nichols RE, McNutt SH. Studi ablasi korpus luteum dan penggantian progesteron terapi selama kebuntingan pada sapi. Apakah J Dokter Hewan Res. 1952;13:446-51. PM Tengah:12996761.

McNatty KP, Hunter WM, McNeilly AS, Sawers RS. Perubahan konsentrasi hipofisis dan steroid hormon dalam cairan folikel folikel graaf manusia sepanjang siklus menstruasi. J Endokrinol. 1975;64(3):555-71. http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.0640555. PM Tengah:1133546.

McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ. Lingkungan mikro antral manusia folikel: hubungan timbal balik antara kadar steroid dalam cairan antral, populasi sel granulosa, dan status oosit in vivo dan in vitro. J Clin Endokrinol Metab. 1979;49(6):851-60. http://dx.doi.org/10.1210/jcem-49-6-851. PM pertengahan: 511976.

Merk FB, Botticelli CR, Albright JT. Respon antar sel terhadap estrogen oleh sel granulosa pada tikus indung telur; studi mikroskop elektron. Endokrinologi. 1972;90(4):992-1007. http://dx.doi.org/10.1210/endo-90-4-992. PM Tengah:5011067.

Miller BG, Moore NW, Murphy L, Stone GM. Kehamilan dini pada domba betina: efek estradiol dan progesteron pada metabolisme uterus dan kelangsungan hidup embrio. Aust J Biol Sci. 1977;30(4):279-88. http://dx.doi.org/10.1071/BI9770279. PM Tengah:603457.

Miller BG, Moore NW. Pengaruh progesteron dan estradiol pada metabolisme endometrium dan embrio kelangsungan hidup pada domba betina yang diovariektomi. Teriogenologi. 1976;6(6):636. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(76)90078-9. PM Tengah:1029671.

Monteiro PL Jr, Nascimento AB, Pontes GC, Fernandes GO, Melo LF, Wiltbank MC, Sartori R. Progesteron suplementasi setelah ovulasi: efek pada fungsi korpus luteum dan kesuburan sapi perah yang terkena AI atau ET. Teriogenologi. 2015;84(7):1215-24. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.023. PM Tengah:26255222.

Nadir S, Saacke RG, Bame J, Mullins J, Degelos S. Pengaruh pembekuan air mani dan dosis sperma pada jumlah sperma tambahan, kesuburan, dan kualitas embrio pada sapi yang diinseminasi buatan. J Anim Sains. 1993;71(1):199-204. http://dx.doi.org/10.2527/1993.711199x. PM Tengah:8454543.

Nakamura TJ, Moriya T, Inoue S, Shimazoe T, Watanabe S, Ebihara S, Shinohara K. Estrogen secara berbeda mengatur ekspresi gen Per1 dan Per2 antara jam pusat dan perifer serta antara jaringan reproduksi dan nonreproduksi pada tikus betina. J Neurosci Res. 2005;82(5):622-30. http://dx.doi.org/10.1002/jnr.20677. PM Tengah:16273538.

Nancarrow CD, Bukit JL. Ko-kultur, sekresi saluran telur dan fungsi glikoprotein spesifik saluran telur. Sel Biol Int. 1994;18(12):1105-14. http://dx.doi.org/10.1006/cbir.1994.1037. PM Tengah:7703951.

Keponakan KP, Cardenas H, McClure KE, Ott TL, Bazer FW, Paus WF. Pengaruh administrasi pada manusia chorionic gonadotropin atau progesteron sebelum ibu mengetahui kebuntingan pada perkembangan blastokista dan kebuntingan pada domba. J Anim Sains. 1994;72(2):453-8. http://dx.doi.org/10.2527/1994.722453x. PM Tengah:8157530.

Northrop EJ, Rich JJJ, Cushman RA, McNeel AK, Soares EM, Brooks K, Spencer TE, Perry GA. Efek dari estradiol praovulasi pada lingkungan uterus dan kelangsungan hidup konsepsi mulai dari pembuahan hingga pengakuan ibu atas kehamilan. Reproduksi Biol. 2018;99(3):629-38. http://dx.doi.org/10.1093/biolre/ioy086. PM Tengah:29672673.

Ozturk S, Demir R. Fungsi khusus estrogen dan progesteron dalam pembentukan rahim penerimaan dan implantasi embrio. Histol Histopatol. 2010;25(9):1215-28. PM Tengah:20607663.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, NL Pertama. Kapasitasi sperma sapi oleh heparin: efek penghambatan glukosa dan peran pH intraseluler. Reproduksi Biol. 1989;41(4):683-99. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod41.4.683. PM:2620077.

Parrott JA, Skinner MK. Regulasi perkembangan dan hormonal faktor pertumbuhan keratinosit ekspresi dan tindakan dalam folikel ovarium. Endokrinologi. 1998;139(1):228-35. http://dx.doi.org/10.1210/endo.139.1.5680. PM Tengah:9421419.

Pereira MH, Rodrigues AD, Carvalho RJ, Wiltbank MC, Vasconcelos JL. Menambah panjang estradiol dan protokol inseminasi buatan dengan waktu progesteron mengurangi keguguran pada sapi perah menyusui. J Ilmu Susu. 2014;97(3):1454-64. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7287. PM Tengah:24393173.

Perry GA, Perry BL. Pengaruh konsentrasi estradiol sebelum ovulasi dan permulaan estrus berdiri pH uterus pada sapi potong. Endokrinol Anim Domestik. 2008a;34(3):333-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2007.09.003. PM Tengah:17980539.

Perry GA, Perry BL. Pengaruh standing estrus dan suplemen estradiol terhadap perubahan pH uterus selama protokol inseminasi buatan waktu tetap. J Anim Sains. 2008b;86(11):2928-35. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1181. PM Tengah:18641170.

Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. Hubungan antara ukuran folikel saat inseminasi dan keberhasilan kehamilan. Proc Natl Acad Sci AS. 2005;102(14):5268-73. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501700102. PM Tengah:15795381.

Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Hubungan antara ukuran folikel ovulasi dan keberhasilan kebuntingan pada sapi dara. J Anim Sains. 2007;85(3):684-9. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2006-519. PM Tengah:17060416.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Sinkronisasi ovulasi pada sapi perah menggunakan $PGF_{2\alpha}$dan GnRH. Teriogenologi. 1995;44(7):915-23. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H. PM Tengah:16727787.

Puyuh LK, Cushman RA, Keel BN, Gonda MG, Perry GA. Konsentrasi estradiol praovulasi mempengaruhi ekspresi gen oviduktal. Dalam: Pertemuan Tahunan Masyarakat untuk Studi Reproduksi; 2021 15-18 Desember; St. Louis, Amerika Serikat. Reston: Masyarakat Studi Reproduksi; 2021. hal. MO2021.

Rawy M, Mido S, Ali HE-S, Derar D, Megahed G, Kitahara G, Osawa T. Pengaruh estradiol eksogen Benzoat terhadap aliran darah uterus pada sapi perah pasca melahirkan. Ilmu Reproduksi Anim. 2018;192:136-45. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.001. PM Tengah:29550273.

Reilly CM, Cannady WE, Mahesh VB, Stopper VS, De Sevilla LM, Mills TM. Durasi paparan estrogen sebelum stimulasi hormon perangsang folikel sangat penting untuk pertumbuhan dan diferensiasi sel granulosa pada tikus. Reproduksi Biol. 1996;54(6):1336-42. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod54.6.1336. PM Tengah:8724362.

Richardson BN, Hill SL, Stevenson JS, Djira GD, Perry GA. Ekspresi estrus sebelum pengaruh AI pada waktu tetap tingkat pembuahan dan faktor-faktor yang mempengaruhi ekspresi estrus dan pengulangan ekspresi estrus pada musim kawin berurutan. Ilmu Reproduksi Anim. 2016;166:133-40. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.013. PM Tengah:26805603.

Robinson NA, Leslie KE, Walton JS. Pengaruh pengobatan dengan progesteron pada tingkat kehamilan dan plasma konsentrasi progesteron pada sapi Holstein. J Ilmu Susu. 1989;72(1):202-7. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79098-6. PM Tengah:2925946.

Ryan M, Mihm M, Roche JF. Pengaruh GnRH yang diberikan sebelum atau sesudah dominasi terhadap respon gonadotropin dan nasib gelombang folikel pada sapi perah pasca melahirkan. J Reproduksi Subur. 1998;21:61.

Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvao KN. Pengaruh tingkat kematian embrio pada sapi kemanjuran program sinkronisasi estrus. Ilmu Reproduksi Anim. 2004;82-83:513-35. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.015. PM Tengah:15271477.

Sartori R, Gumen A, Guenther JN, Souza AH, Caraviello DZ, Wiltbank MC. Perbandingan buatan inseminasi versus transfer embrio pada sapi perah menyusui. Teriogenologi. 2006;65(7):1311-21. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.055. PM Tengah:16226307.

Seidel GE. Bioteknologi reproduksi untuk produksi daging sapi yang menguntungkan. Dalam: Peningkatan Daging Sapi Federasi 27thSimposium Penelitian dan Pertemuan Tahunan; 1995 Mei-31-Juni 31-3; Sheridan, WY, Amerika Serikat. Federasi Peningkatan Daging Sapi; 1995. hal. 28.

Souza AH, Silva EP, Cunha AP, Gumen A, Ayres H, Brusveen DJ, Guenther JN, Wiltbank MC. Evaluasi ultrasonografi ketebalan endometrium dekat waktu AI sebagai prediktor kesuburan pada sapi perah berproduksi tinggi. Teriogenologi. 2011;75(4):722-33. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.013. PM Tengah:21196031.

Spencer TE, Bazer FW. Faktor uterus dan plasenta yang mengatur pertumbuhan konseptus pada hewan peliharaan. J Sains Animasi. 2004;82(E-Suppl):E4-13. PM pertengahan:15471813.

Spencer TE, Sandra O, Wolf E. Gen yang terlibat dalam interaksi konseptus-endometrium pada ruminansia: wawasan dari reduksionisme dan pemikiran tentang pendekatan holistik. Reproduksi. 2008;135(2):165-79. http://dx.doi.org/10.1530/REP-07-0327. PM Tengah:18239047.

Stanke DF, Sikes JD, DeYoung DW, Tumbleson ME. Protein dan asam amino dalam cairan oviducal sapi. J Perbanyak Subur. 1974;38(2):493-6. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0380493. PM Tengah:4134580.

Sugiura T, Akiyoshi S, Inoue F, Yanagawa Y, Moriyoshi M, Tajima M, Katagiri S. Hubungan antara ketebalan endometrium sapi dan konsentrasi progesteron dan estradiol plasma pada estrus alami dan terinduksi. J Reprod Pengembang. 2018;64(2):135-43. http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2017-139. PM Tengah:29398684.

Sutton R, Nancarrow CD, Wallace AL. Efek estrogen dan musiman pada produksi estrus-glikoprotein terkait dalam cairan ovidukal domba. J Reproduksi Subur. 1986;77(2):645-53. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0770645. PM Tengah:3735255.

Ulbrich SE, Frohlich T, Schulke K, Englberger E, Waldschmitt N, Arnold GJ, Reichenbach HD, Reichenbach M, Wolf E, Meyer HH, Bauersachs S. Bukti ekspresi serpin uterus yang bergantung pada estrogen (SERPINA14) selama estrus pada epitel dan lumen kelenjar endometrium sapi. Reproduksi Biol. 2009;81(4):795-805. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.075184. PM Pertengahan:19494250.

Van Cleeff J, Drost M, Thatcher WW. Pengaruh suplementasi progesteron pasca inseminasi pada kesuburan dan respon estrus berikutnya pada sapi perah. Teriogenologi. 1991;36(5):795-807. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(91)90345-E. PMid:16727048.Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Pengurangan ukuran folikel ovulasi mengurangi ukuran luteal dan tingkat kehamilan. Teriogenologi. 2001;56(2):307-14. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00565-9. PM Tengah:11480622.

Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC. Tingkat sinkronisasi, ukuran ovulasi folikel, dan tingkat kebuntingan setelah sinkronisasi ovulasi dimulai pada hari yang berbeda dalam siklus estrus pada sapi perah menyusui. Teriogenologi. 1999;52(6):1067-78. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00195-8. PM Tengah:10735113.

Walton JS, Halbert GW, Robinson NA, Leslie KE. Efek progesteron dan korionik manusia pemberian gonadotropin lima hari pasca inseminasi terhadap konsentrasi progesteron dalam plasma dan susu serta tingkat kebuntingan sapi perah normal dan sapi perah berulang. Bisakah J Dokter Hewan Res. 1990;54(3):305-8. PM Tengah:2379109.

Wang XN, Greenwald GS. Efek sinergis steroid dengan FSH pada folikulogenesis, steroidogenesis dan Reseptor FSH dan hCG pada tikus yang mengalami hipofisektomi. J Reproduksi Subur. 1993;99(2):403-13. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0990403. PM Tengah:8107022.

Wegner CC, Killian GJ. Asosiasi in vitro dan in vivo dari protein terkait estrus saluran telur dengan sapi zona pelusida. Pengembang Reprod Mol. 1991;29(1):77-84. http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080290112. PM Tengah:2054184.

Welsh TH Jr, Zhuang LZ, Hsueh AJW. Augmentasi estrogen dari progestin yang distimulasi gonadotropin biosintesis dalam sel granulosa tikus yang dikultur. Endokrinologi. 1983;112(6):1916-24. http://dx.doi.org/10.1210/endo-112-6-1916. PM Tengah:6303748.

Anggota Parlemen Wijayagunawardane, Miyamoto A, Taquahashi Y, Gabler C, Acosta TJ, Nishimura M, Killian G, Sato K. Regulasi in vitro sekresi lokal dan kontraksi saluran telur sapi: stimulasi oleh hormon luteinizing, endothelin-1 dan prostaglandin, dan penghambatan oleh oksitosin. J Endokrinol. 2001;168(1):117-30.http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.1680117. PM Tengah:11139776.

Winuthayanon W, Bernhardt ML, Padilla-Banks E, Myers PH, Edin ML, Lih FB, Hewitt SC, Korach KS, Williams CJ. Pensinyalan alfa reseptor estrogen oviduktal mencegah kematian embrio yang dimediasi protease. ehidup. 2015;4:e10453. http://dx.doi.org/10.7554/eLife.10453. PM Tengah:26623518.

Witkowska E. Reaktivitas sel epitel saluran telur sapi in vitro pada eksogenik hormon gonadotrofik dan steroid. Folia Histokimia Sitokimia. 1979;17(3):225-38.

Wong PY, Lee WM, Tsang AY. Efek natrium ekstraseluler pada pelepasan asam dan inisiasi motilitas spermatozoa epididimis ekor tikus in vitro. Exp Res Sel. 1981;131(1):97-104. http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(81)90410-9. PM Tengah:7447992.

Zelinski MB, Noel P, Weber DW, Stormshak F. Karakterisasi reseptor progesteron sitoplasma di endometrium sapi pada saat proestrus dan diestrus. J Anim Sains. 1982;55(2):376-83. http://dx.doi.org/10.2527/jas1982.552376x. PM Tengah:6890550.

Zhuang LZ, Adashi EY, Hsueh AJW. Peningkatan langsung estrogen ovarium yang distimulasi gonadotropin biosintesis oleh estrogen dan klomifen sitrat. Endokrinologi. 1982;110(6):2219-21. http://dx.doi.org/10.1210/endo-110-6-2219. PM Tengah:6804221.

Kontribusi penulis

GAP: Konseptualisasi, Perolehan pendanaan, Pengawasan, Penulisan – draf asli, Penulisan – review & editing; JNK: Penulisan – draf asli, Penulisan – review & penyuntingan; LKQ: Penulisan – draf asli, Penulisan – review & penyuntingan.

animal

MDPI

Tinjauan

Evaluasi Embrio Sapi Pra-Implantasi—Dari Optik hingga Omics dan Selebihnya

RA Chanaka Rabel[1,2], Paula V. Marchioretto[1], Elizabeth A.Bangert[1], Kenneth Wilson[1], Derek J.Milner[1,2] dan Matthew B. Wheeler[1,2,3,4,*]

[1] Departemen Ilmu Hewan, Universitas Illinois di Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, AS; rrabel2@illinois.edu (RACR); paulav@illinois.edu (PVM); eb21@illinois.edu (EAB); kwilson8@illinois.edu (KW); dmilner@illinois.edu (DJM)
[2] Institut Biologi Genomik Carl R. Woese, Universitas Illinois di Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801,
[3] Departemen Bioteknologi AS, Universitas Illinois di Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, Departemen Ilmu
[4] Biomedis dan Translasi AS, Carle- Fakultas Kedokteran Illinois, Universitas Illinois di Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, AS
* Korespondensi: mbwheele@illinois.edu ; Telp: +1-217-333-2239

Ringkasan Sederhana: Dengan praktik pembiakan konvensional, bahkan sapi perah/pedaging terbaik sekalipun kemungkinan besar hanya akan menghasilkan tidak lebih dari setengah lusin anak sapi seumur hidupnya; suatu kejahatan, tidakkah kamu setuju? Sebaliknya, dengan teknologi transfer embrio, seekor sapi dapat mewariskan genetikanya kepada ratusan anak sapi melalui sapi pengganti. Oleh karena itu, transfer embrio, khususnya yang melibatkan embrio yang dihasilkan melalui fertilisasi in vitro, juga dikenal sebagai IVF, sedang diadopsi secara luas. Namun, tingkat kehamilan akibat transfer embrio IVF masih belum mengesankan. Sebelum dipindahkan, embrio dievaluasi di bawah mikroskop, dan hanya embrio berkualitas tinggi yang ditransfer. Sayangnya, mikroskop tidak dapat membedakan secara akurat antara embrio berkualitas tinggi dan embrio berkualitas rendah. Banyak metodologi evaluasi embrio yang telah diuji hingga saat ini untuk mencari pengganti evaluasi embrio berbasis mikroskop, misalnya sistem mikroskopis canggih dan evaluasi genetika serta protein/molekul yang disekresikan. Kabar baiknya: banyak dari mereka yang dapat memisahkan gandum dari sekam secara akurat. Kabar buruknya: banyak diantaranya yang mahal, mematikan embrio saat evaluasi, terlalu rumit, dan/atau melelahkan sehingga tidak berguna di garis depan, yaitu ribuan fasilitas produksi/transfer embrio. Artikel ini mengulas teknik paling umum (dan tidak terlalu umum) yang telah diuji hingga saat ini dan memberikan wawasan tentang teknik yang memiliki potensi tertinggi untuk menggantikan evaluasi embrio berbasis mikroskop. *di dalam-bidang*aplikasi.

check for updates

Kutipan: Rabel, RAC; Marchioretto, PV; Bangert, EA; Wilson, K.; Milner, DJ; Wheeler, MB Evaluasi Embrio Sapi Pra-Implantasi—Dari Optik hingga Omics dan Selebihnya.*Hewan* **2023**, *13*, 2102. https://doi.org/ 10.3390/ ani13132102

Editor Akademik: Ramanathan K. Kasimanickam dan John P. Kastelik

Diterima: 22 Mei 2023
Direvisi: 16 Juni 2023
Diterima: 17 Juni 2023
Diterbitkan: 24 Juni 2023

Hak cipta:© 2023 oleh penulis. Pemegang Lisensi MDPI, Basel, Swiss. Artikel ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan lisensi Creative Commons Attribution (CC BY) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

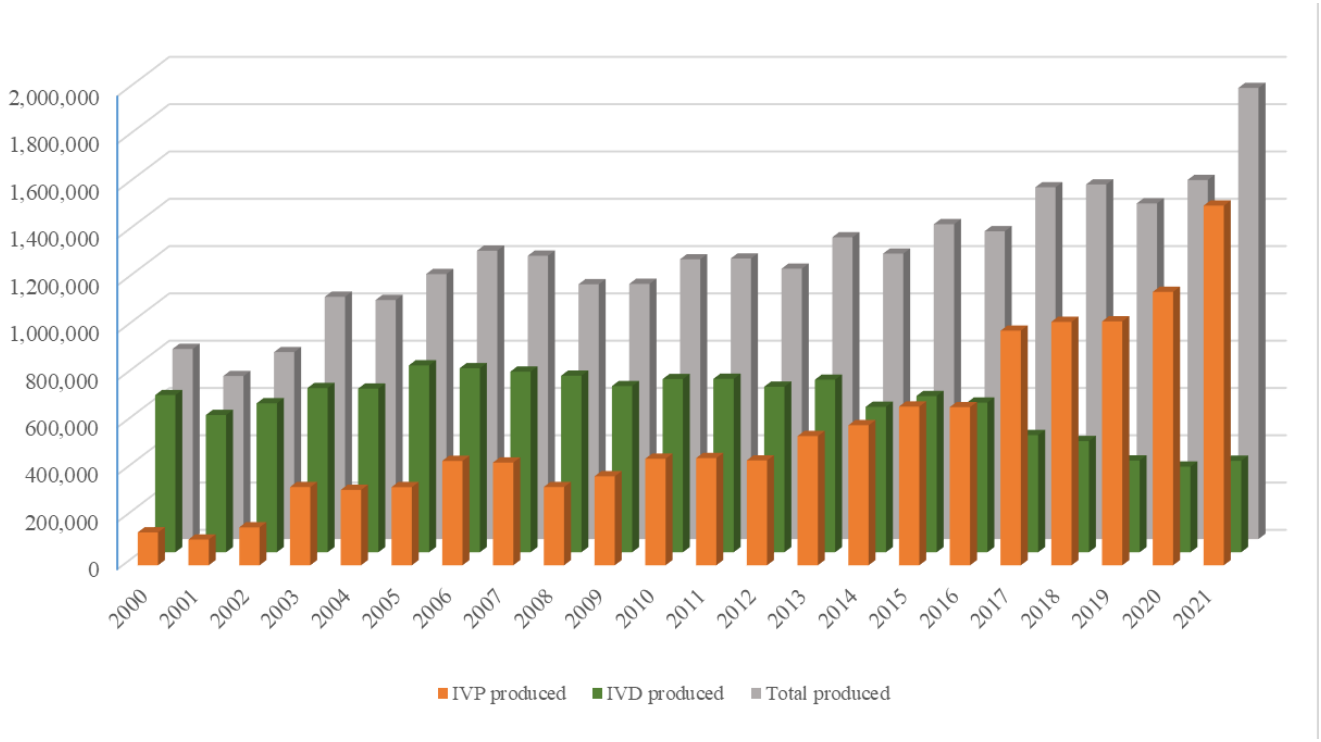
Abstrak: Sekitar 80% dari ~1,5 juta embrio sapi yang ditransfer pada tahun 2021 diproduksi secara in vitro. Namun, hanya ~27% dari embrio IVP yang ditransfer akan menghasilkan kelahiran hidup. Sekitar 73% kegagalan kehamilan sebagian disebabkan oleh transfer embrio berkualitas buruk, akibat kesalahan evaluasi morfologi berbasis stereomikroskopi, yang merupakan metode pilihan saat ini untuk evaluasi embrio pra-transfer. Banyak metodologi mikroskopis (misalnya, kontras interferensi diferensial, elektron, fluoresen, selang waktu, dan mikroskop berbasis kecerdasan buatan) dan non-mikroskopik (misalnya, genomik, transkriptomik, epigenomik, proteomik, metabolomik, dan resonansi magnetik nuklir) telah digunakan. diuji untuk menemukan teknik evaluasi embrio yang lebih unggul daripada evaluasi morfologi. Banyak dari alat penelitian ini yang dapat menentukan kualitas/viabilitas embrio secara akurat; namun sebagian besar bersifat invasif, mahal, melelahkan, canggih secara teknis, dan/atau memakan waktu, sehingga menjadikannya sia-sia dalam konteks*di lapangan* evaluasi embrio. Betapapun akuratnya metode tersebut, menggunakan metode yang rumit, seperti pengurutan RNA, chip SNP, spektrometri massa, dan mikroskop multifoton, di ribuan fasilitas produksi/pengumpulan embrio adalah hal yang tidak praktis. Oleh karena itu, penelitian masa depan diperlukan untuk berinovasi*fi ramah orang tua*, sederhana*tes bangku*menggunakan temuan yang sudah tersedia, khususnya dari metodologi penelitian berbasis omics. Pemantauan selang waktu dan analisis gambar otomatis berbasis kecerdasan buatan juga mempunyai potensi untuk evaluasi embrio yang akurat; namun, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menginovasi pilihan-pilihan yang layak secara ekonomi*di lapangan*aplikasi.

Kata kunci:evaluasi embrio sapi; produksi in vitro; embrio yang diturunkan secara in vivo; fertilisasi in vitro; penilaian embrio sapi; kualitas embrio pra-implantasi; analisis morfologi blastokista sapi perah; pementasan embrio sapi potong; transfer embrio sapi; teknologi reproduksi berbantuan

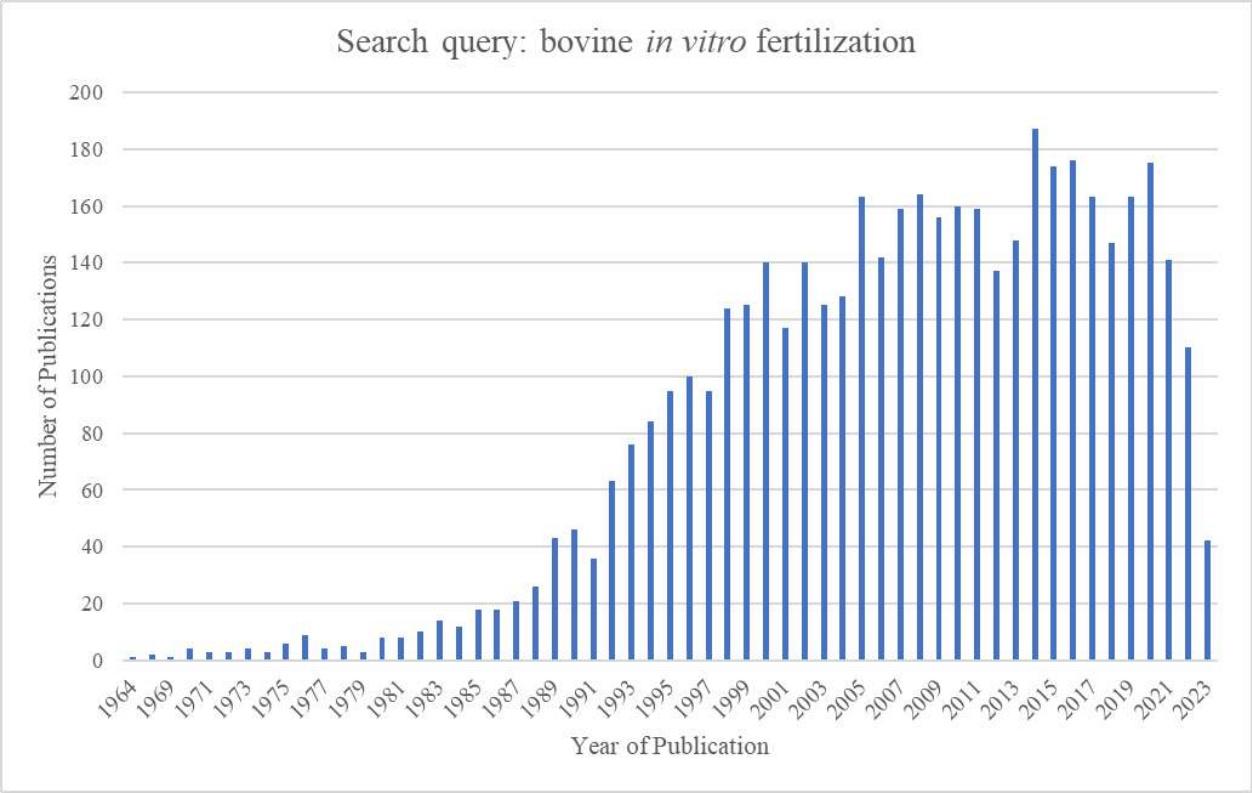
---

1. Perkenalan

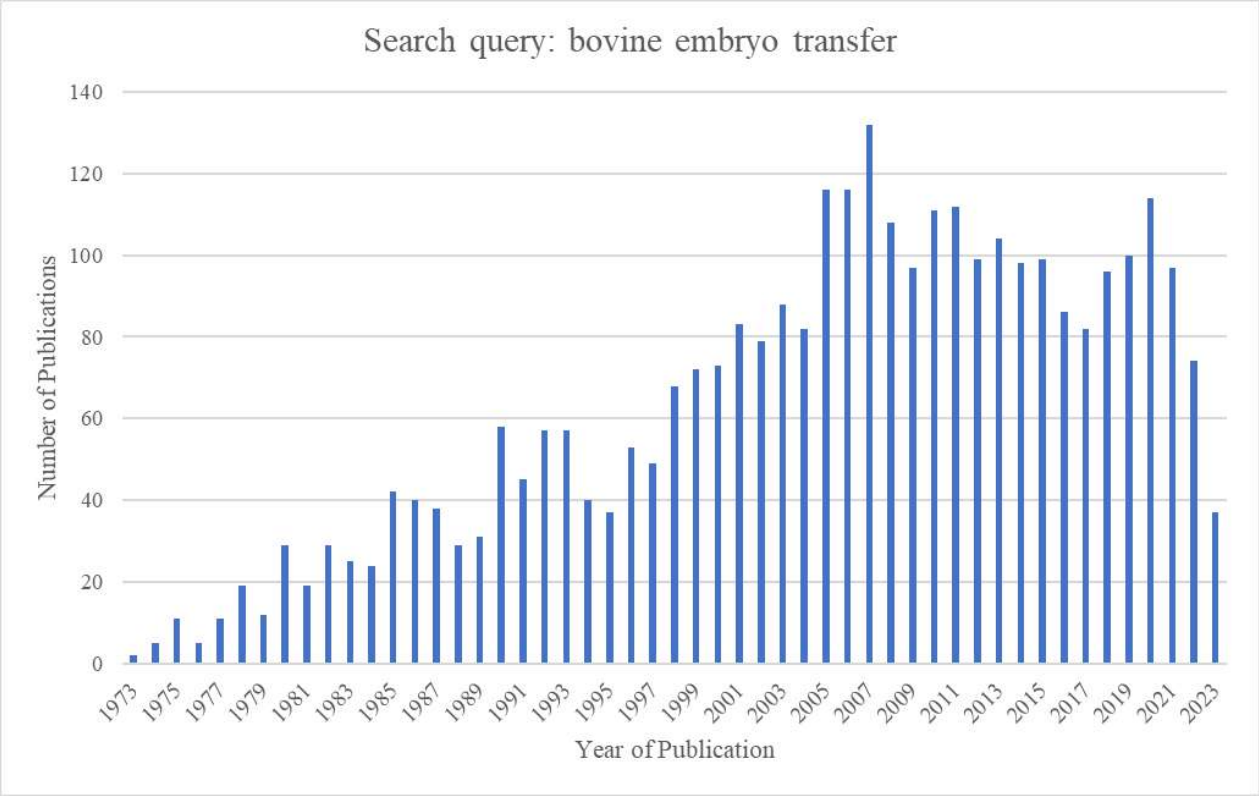
Pertumbuhan populasi dunia telah menciptakan permintaan terhadap hewan yang terus meningkat protein. Industri daging sapi dan susu memainkan peran yang sangat besar dalam hal ini, setiap tahunnya menyumbang >72 juta metrik ton daging (21% dari produksi daging global) dan >500 juta metrik ton susu ke pasar global.*Reproduksi*merupakan penggerak utama daging dan susu sapi*produksi*industri. Oleh karena itu, Assisted Reproductive Technologies (ARTs) seperti produksi embrio in vitro (IVP), produksi embrio turunan in vivo (IVD), dan transfer embrio (ET) telah menjadi sangat penting dalam industri daging sapi dan sapi perah [1]. Seperti yang diilustrasikan pada Gambar1, produksi tahunan embrio sapi yang dapat ditransfer meningkat hampir dua kali lipat dalam periode 12 tahun dari 2009 hingga 2021. Yang lebih mengejutkan lagi adalah peralihan produksi embrio dari IVD ke IVP, dengan produksi embrio melalui IVP meningkat empat kali lipat dalam periode yang sama. Pada tahun 2021, lebih dari 1,5 juta embrio IVP yang dapat ditransfer telah diproduksi (Gambar1), dimana hampir 80% (~1,2 juta) telah ditransfer [2]. Sejalan dengan pesatnya perluasan IVP, minat komunitas ilmiah dan publikasi penelitian juga meningkat berkali-kali lipat selama beberapa dekade terakhir (Gambar2A–C).



Gambar 1. Produksi tahunan IVP (batang oranye), IVD (batang hijau), dan jumlah total (batang abu-abu) embrio sapi. Disusun dari Laporan Komite Pengambilan Data tahunan Masyarakat Transfer Embrio Internasional tahun 2001–2022.

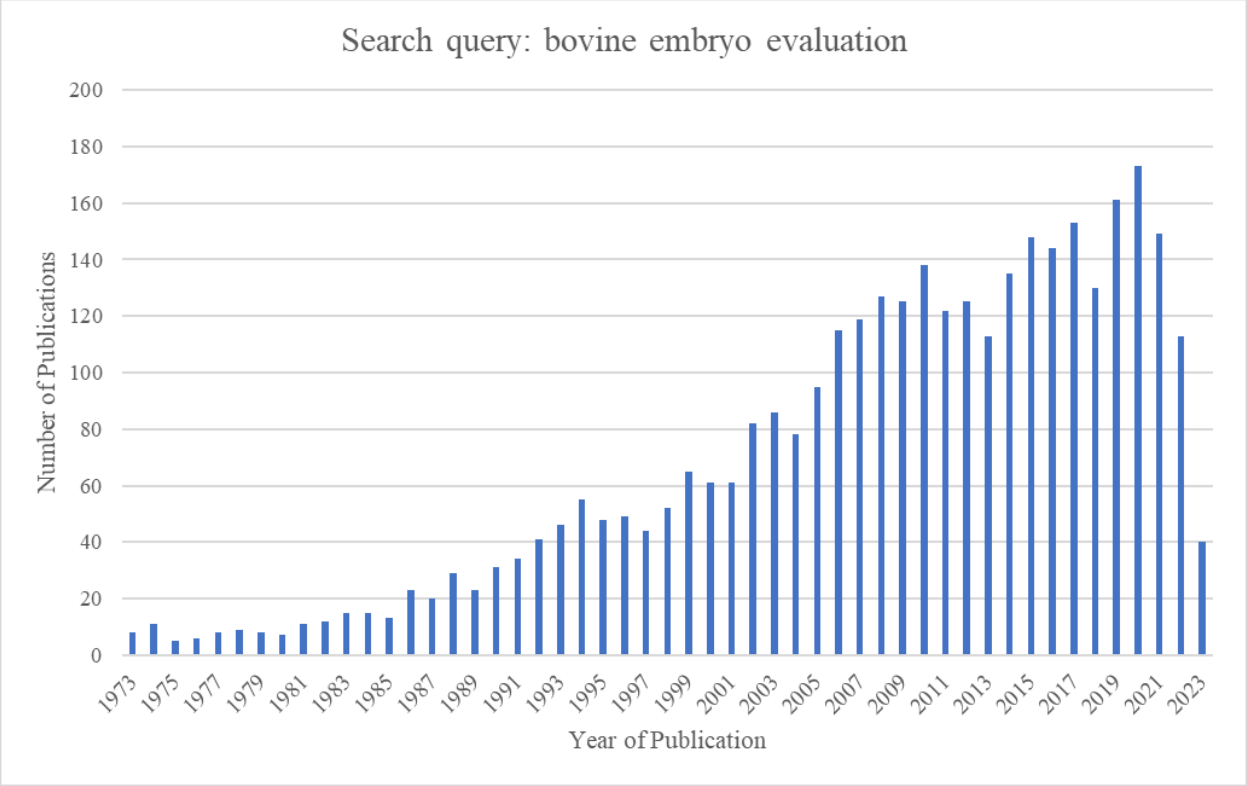


(**A**)



(**B**)

Gambar 2.*Lanjutan*



(**C**)

Gambar 2. Jumlah publikasi yang diidentifikasi diDipublikasikan.govmenurut tahun untuk permintaan pencarian (**A**) "fertilisasi in vitro sapi" (1964–2023), (**B**) "transfer embrio sapi" (1973–2023), dan (**C**) "evaluasi embrio sapi" (1973–2023).

Secara umum diterima bahwa kompetensi perkembangan, kualitas, dan cryosurvival embrio IVP secara keseluruhan lebih rendah dibandingkan embrio IVD. Lebih jauh lagi, tingkat kehamilan (PRs) yang dihasilkan dari transfer embrio IVP lebih rendah dibandingkan dengan transfer embrio IVD yang berkualitas dan sesuai stadium yang ditinjau oleh [3–6]. Baik untuk embrio IVP maupun IVD, telah diketahui bahwa transfer blastokista berkualitas tinggi menghasilkan PR yang lebih tinggi dibandingkan dengan transfer blastokista berkualitas rendah.7–9]. Oleh karena itu, jika embrio dapat dievaluasi secara akurat dan embrio berkualitas tinggi dapat dipilih untuk ET, nilai komersial dari embrio terpilih akan meningkat, yang kemudian diikuti dengan penurunan jumlah penerima dan peningkatan efisiensi ET secara keseluruhan [10]. Oleh karena itu, salah satu faktor terpenting yang terkait dengan keberhasilan penerapan ART adalah*evaluasi embrio* sebelum dibekukan atau ditransfer ke penerima [11,12]. Saat ini, metode yang paling banyak digunakan untuk menentukan kualitas embrio adalah evaluasi morfologi menggunakan stereomikroskopi [6]. Namun, hal ini dianggap memiliki akurasi yang buruk dan reproduktifitas yang buruk serta bias oleh subjektivitas penilai, yaitu variabilitas intra dan antar pengamat [1,5].

Bersama-sama, tren saat ini yang mendukung IVP dan keterbatasan metode evaluasi embrio berbasis morfologi saat ini menuntut studi mendalam tentang embrio sapi pra-implantasi (i) untuk lebih memahami fisiologi perkembangan embrio dan (ii) untuk menemukan penanda viabilitas/kualitas embrio. yang dapat digunakan untuk prediksi akurat kelangsungan hidup embrio pasca transfer dan hasil kehamilan. Hasilnya, beragam metodologi, mulai dari metodologi optik hingga berbasis omics hingga pengeditan gen dan segala hal lainnya, telah digunakan untuk mengevaluasi dan menganalisis embrio sapi.

Tujuan dari tinjauan ini adalah untuk memberikan gambaran umum tentang berbagai metodologi evaluasi embrio yang digunakan tidak hanya selama era pasca-IVP tetapi juga mulai dari tahun 1931, catatan pertama mengenai anatomi mikroskopis embrio sapi pra-implantasi yang tersedia sejak hampir satu abad yang lalu [1,2]. Selanjutnya, kami juga akan memberikan wawasan tentang evaluasi embrio

metodologi yang memiliki potensi tertinggi untuk diadopsi di*permukaan tanah*sebagai pengganti evaluasi embrio morfologi berbasis stereomikroskopi konvensional.

Kami menyimpulkan bahwa alat evaluasi embrio yang canggih seperti metodologi berbasis omics tidak cocok untuk digunakan*secara langsung*digunakan untuk*di lapangan*evaluasi embrio. Namun temuan dari metodologi ini dapat diterapkan*secara tidak langsung*untuk*di lapangan*evaluasi embrio jika *firamah orang tua*, sederhana, dan terjangkau*tes bangku*dikembangkan. Lebih lanjut, temuan dari pemantauan selang waktu (TLM) dan analisis gambar otomatis berbasis kecerdasan buatan terlihat sangat menjanjikan. Dengan perbaikan lebih lanjut dan inovasi pilihan yang terjangkau secara ekonomi, hal tersebut dapat langsung dimanfaatkan*di lapangan*aplikasi.

2. Evaluasi Embrio Sapi Pra-Implantasi

Evaluasi embrio ada dua dan biasanya dilakukan sebelum kriopreservasi. Mereka dievaluasi untuk*tahap perkembangan (kelas)*Dan*kualitas*. Saat ini, hanya embrio yang memenuhi kriteria minimum di kedua aspek tersebut yang dipilih untuk dibekukan atau dipindahkan langsung.

2.1. Evaluasi Kualitas Embrio

Anatomi mikroskopis embrio sapi pertama kali dijelaskan pada tahun 1931 untuk a *sel telur bersel dua*[13], dan tahapan selanjutnya hingga tahap blastokista ditandai pada tahun 1946 [14]. Namun, baru pada pertengahan tahun 1970-an, transfer embrio sapi, yang sejauh ini dilakukan pada skala eksperimental, diubah menjadi usaha skala komersial [15], bahwa upaya pertama dalam evaluasi embrio telah dilakukan [16]. Para penulis menilai embrio dan morula bersel 8–12 pada skala 1 hingga 5 (Tabel1) "*berdasarkan kekompakan, simetri dan kepadatan blastomer*". Mereka mengamati bahwa angka kehamilan akibat transfer morula lebih tinggi dibandingkan dengan transfer embrio bersel 8-12, dan angka kehamilan tertinggi diperoleh dengan mentransfer morula dengan kualitas tertinggi, yaitu peringkat 5. Namun, penulis mengakui hal itu*"Penilaian ini, pada dasarnya, bersifat subyektif dan oleh karena itu analisis yang kaku terhadap hasilnya tidak akan benar-benar ilmiah."*.

Seperangkat kriteria yang relatif kurang subyektif digunakan dalam laporan tahun 1978 yang mengkategorikan embrio ke dalam empat kelas, yaitu, sangat baik, baik, sedang, dan buruk ([17]; Meja1). Mereka mengamati bahwa, setelah dipindahkan, embrio yang dikategorikan "sangat baik" dan "baik" memberikan tingkat kehamilan (PR) tertinggi, sedangkan embrio yang dikategorikan "buruk" memberikan PR terendah. Sebuah penelitian tahun 1981 mengadopsi sistem klasifikasi di mana embrio diberi peringkat 2, 3, atau 4 ([18]; Meja1). Mirip dengan penelitian sebelumnya, embrio dengan rating lebih tinggi memberikan tingkat kehamilan lebih tinggi dibandingkan embrio dengan rating lebih rendah. Sebuah studi tahun 1983 ([7]; Meja1) menggunakan sistem klasifikasi "sangat baik", "baik", "sedang", dan "buruk" yang sama seperti yang digunakan oleh Elsden, Nelson, 1978 [17], tetapi dengan kriteria penentu yang sedikit dimodifikasi. Konsisten dengan penelitian sebelumnya, embrio yang bagus dan bagus memberikan tingkat kehamilan terbaik. Mereka kemudian menyimpulkan bahwa kualitas embrio, bukan tahap perkembangannya (16 sel melalui blastokista yang menetas), merupakan prediktor paling akurat mengenai kompetensi embrio untuk menghasilkan kehamilan. Temuan ini bertentangan dengan pengamatan sebelumnya dari Shea, Hines, 1976 [16], dan Newcomb dan Rowson, 1975 [19], dimana penulis mengamati PR yang lebih tinggi ketika mentransfer morula dibandingkan dengan embrio bersel 8-12 dan PR yang lebih tinggi ketika mentransfer embrio berumur 5-7 hari dibandingkan dengan embrio berumur <5 hari. Pengamatan ini menyoroti perlunya merancang strategi untuk penilaian embrio, karena embrio tahap sangat awal dengan sedikitnya 4-8 blastomer serta embrio tahap sangat akhir hingga blastokista yang menetas dipindahkan selama periode waktu ini.

Selain kekompakan, simetri, dan kepadatan yang diperhatikan oleh Shea, Hines, 1976 [16], untuk evaluasi embrio, klasifikasi selanjutnya juga mempertimbangkan kriteria seperti warna dan bentuk blastomer, tanda-tanda degenerasi seperti vesikulasi, ekstrusi blastomer dari massa sel utama, keterbelakangan embrio, dan integritas zona pelusida. .

Tabel 1. Evaluasi kualitas embrio sapi berdasarkan ciri morfologi.

Sumber	Kriteria
[16]	"5: penampilan luar biasa 4 3: rata-rata muncul 2 1: penampilan sangat buruk" dinilai "*berdasarkan kekompakan, simetri dan kepadatan blastomer*"
[17]	"Luar biasa—dinilai berada pada tahap perkembangan normal pada saat pemeriksaan; embrio simetris, dan blastomer berbentuk poligonal membentuk massa padat pada tahap morula. Baik—mirip dengan embrio unggul namun asimetris, mengandung blastomer yang tidak termasuk dalam massa morula utama, atau sedikit terbelakang dibandingkan dengan embrio lain yang diperoleh dari donor yang sama. Sedang—embrio mengalami keterlambatan perkembangan selama 1 hingga 2 hari, memiliki blastomer berbentuk bola dibandingkan poligonal pada tahap morula, mengandung blastomer dengan berbagai ukuran, memiliki tanda-tanda degenerasi seperti vesikel besar di dalam sel, dan/atau lebih gelap atau lebih terang dari biasanya Buruk—embrio mengalami keterlambatan perkembangan selama 2 hari atau lebih, memiliki membran sel yang tidak jelas, dan/atau memiliki kelainan yang lebih parah dibandingkan embrio normal"
[18]	"4—penampilan embrio di atas rata-rata (simetris sempurna, granulasi merata, tidak ada deformasi pada zona pelusida, tidak ada blastomer yang terekstrusi) 3—penampilan embrio rata-rata 2—penampilan embrio di bawah rata-rata (ukuran blastomer tidak merata, ekstrusi blastomer yang luas, bukti pecahnya membran)"
[7]	"Luar biasa—embrio ideal, bulat, simetris dengan sel-sel dengan ukuran, warna, dan tekstur seragam Bagus—ketidaksempurnaan sepele seperti beberapa blastomer yang diekstrusi, bentuk tidak beraturan, sedikit vesikel Biasa saja—masalah yang jelas namun tidak parah, adanya blastomer yang terekstrusi, vesikulasi, sedikit sel yang mengalami degenerasi Buruk—masalah parah, banyak blastomer yang terekstrusi, sel-sel yang mengalami degenerasi, sel-sel dengan berbagai ukuran, banyak vesikel besar tetapi massa embrio tampak layak"
[20]	"Kode 1: Sangat Baik atau Bagus Kode 2: Cukup Baik Kode 3: Buruk Kode 4: Merosot"

2.2. Evaluasi Staging/Grading Embrio

Tak satu pun dari sistem evaluasi embrio yang ditunjukkan pada Tabel1mengenali tahapan perkembangan embrio; yaitu, embrio yang dikategorikan "sangat baik" dapat berupa morula, blastokista awal, blastokista yang diperluas, dll. Meskipun sistem pengkodean yang mengidentifikasi tahapan perkembangan embrio telah dipublikasikan ([21]; Meja2), hal ini tidak dimasukkan ke dalam kriteria evaluasi embrio sampai International Embryo Transfer Society (IETS) memperkenalkan sistem pengkodean dua digit yang akan mendeskripsikan embrio secara seragam dan sistematis berdasarkan tahap perkembangannya serta kualitasnya [20] (Gambar Tambahan S1 – S19). Digit pertama mengidentifikasi tahap perkembangan embrio, mulai dari 1 (oosit yang tidak dibuahi) hingga 9 (blastokista yang menetas dan berkembang; Tabel2), sedangkan digit kedua mengidentifikasi kualitas embrio (berdasarkan ciri morfologi), berkisar antara 1 (sangat baik/baik) hingga 4 (menurun; Tabel2). Misalnya, embrio dengan kode 7–1 mengacu pada blastokista yang diperluas dengan kualitas yang sangat baik/baik. Sistem pengkodean dua digit ini, yang diperkenalkan pada tahun 1998, tetap menjadi standar emas untuk evaluasi dan penilaian embrio dalam industri produksi dan transfer embrio sapi.

Meja 2. Pengkodean berdasarkan tahapan perkembangan embrio sapi.

Sumber	Kode	Kriteria/Definisi
[21]	1	Embrio 2 sel
	2	Embrio 4 sel
	3	Embrio 8 sel
	4	Morula (16–32 sel)
	5	Morula (32–64 sel)
	6	Blastokista
	7	Blastokista yang menetas
[20]	1	Tidak dibuahi
	2	Embrio 2 hingga 16
	3	sel Morula awal
	4	Morula
	5	Blastokista awal
	6	Blastokista
	7	Blastokista yang diperluas
	8	Penetasan blastokista
	9	Blastokista yang menetas

3. Evaluasi/Analisis Embrio—Alat Perdagangan

Menurut norma evaluasi embrio sapi yang diterima saat ini [20], embrio sapi yang belum menetas yang ideal harus memiliki ciri-ciri sebagai berikut: embrio harus kompak, bulat, dan berukuran 150 hingga 190mikrodiameter m (termasuk 12 hingga 15mikrom ketebalan zona pelusida); blastomer harus seragam dalam ukuran, warna, dan tekstur; sitoplasma blastomer harus bebas dari butiran dan vesikel; ruang perivitelline harus bersih dan bebas dari sisa-sisa seluler; dan zona pelusida harus seragam dan bebas dari retakan dan serpihan permukaan (Gambar Tambahan S1 – S19).

Evaluasi embrio biasanya dilakukan menggunakan mikroskop stereo pada suhu 50 hingga 100×pembesaran. Embrio dimasukkan ke dalam wadah penampung yang dilengkapi media penahan dan dievaluasi dengan cara digulung sehingga seluruh embrio dan zona pelusida dapat dilihat dari berbagai sudut. Namun, penilaian morfologi jenis ini dianggap bias oleh subjektivitas penilai, yaitu variabilitas intra dan antar pengamat [5], dan oleh karena itu tidak dianggap 100% dapat diandalkan dan dapat dipercaya [22,23]. Mendukung gagasan ini, perbedaan ultrastruktur [24] dan transkriptom [25] telah dibuktikan pada blastokista sapi yang serupa secara morfologi, memiliki stadium dan kualitas yang sama. Seperti disebutkan sebelumnya, berbagai macam alat telah digunakan untuk mempelajari embrio guna memahami perkembangan pra-implantasi dan untuk mencari metode evaluasi embrio yang sempurna. Bagian berikut membahas alat dan teknik ini secara rinci.

3.1. Analisis Mikroskopis

3.1.1. Mikroskop Cahaya

Mikroskop cahaya telah menjadi salah satu alat paling mendasar dan banyak digunakan dalam biologi selama hampir dua abad. Metode ini banyak digunakan untuk menganalisis sel tetap dan sel hidup dan secara luas dianggap sebagai metode yang paling tidak invasif untuk memperoleh informasi biologis dari sel hidup.26]. Fitur ini membuatnya sangat berguna, bahkan sangat diperlukan, untuk menganalisis embrio dalam penelitian dan perusahaan komersial yang memproduksi embrio sapi untuk pembiakan. Sebagaimana dinyatakan sebelumnya, metode standar untuk mengevaluasi kualitas embrio menggunakan mikroskop cahaya: dalam kasus tertentu, pengamatan langsung morfologi embrio di bawah mikroskop stereo. Namun, pembesaran terbatas ketika menggunakan stereomikroskop, dan rincian morfologi dapat lebih mudah dilihat melalui pengamatan dengan mikroskop majemuk yang menggunakan perbesaran lebih tinggi. Memang benar, sebuah penelitian yang dilakukan pada tahun 2002 yang membandingkan kualitas embrio, yang dievaluasi melalui pengamatan menggunakan mikroskop stereo, mikroskop majemuk standar, dan mikroskop elektron, menemukan bahwa pengamatan dengan mikroskop stereo menyebabkan penilaian kualitas embrio yang berlebihan, karena tanda-tanda degenerasi embrio lebih mudah terlihat pada perbesaran yang lebih tinggi.

tersedia dengan mikroskop majemuk atau mikroskop elektron [27]. Sayangnya, persyaratan persiapan spesimen untuk pengamatan pada perbesaran yang lebih tinggi di bawah mikroskop majemuk atau mikroskop elektron tidak sesuai dengan kelangsungan hidup embrio.

3.1.2. Mikroskop Kontras Interferensi Diferensial (DIC).

Bagi sebagian besar sel hidup yang diamati dengan mikroskop cahaya standar, kontrasnya buruk, dan tampak hampir transparan. Sulit untuk membedakan struktur seluler, tidak peduli kemampuan pembesaran dan daya resolusi lensa yang digunakan, kecuali sel-sel tersebut difiksasi dan diwarnai dengan bahan kimia yang memberikan kontras. Prosedur-prosedur ini hampir selalu membunuh sampel hidup. Oleh karena itu, para ahli mikroskop telah berupaya mengembangkan teknik optik yang memberikan kontras pada struktur seluler tanpa memerlukan penggunaan bahan fiksatif dan pewarna, sehingga memungkinkan visualisasi sel hidup yang lebih baik. Teknik-teknik ini umumnya digunakan dalam mikroskop biologis saat ini dan mencakup mikroskop fase kontras, mikroskop medan gelap, mikroskop cahaya terpolarisasi, kontras modulasi Hoffman, dan mikroskop kontras interferensi diferensial (DIC).

Dikembangkan oleh Georges Nomarski pada awal tahun 1950an [28], DIC memanfaatkan cahaya terpolarisasi yang dilewatkan melalui sebuah prisma, melalui spesimen, dan kemudian melalui prisma lain dan didepolarisasi untuk menghasilkan interferensi yang mengakibatkan satu sisi struktur yang dilewati cahaya tampak terang dan sisi lainnya tampak gelap. Secara keseluruhan, pencitraan sel menggunakan teknik ini menghasilkan efek bayangan yang memberikan tampilan seperti relief 3D pada sel [29].

Mikroskop DIC adalah pilihan yang baik untuk pencitraan embrio dan sel hidup. Pencitraan embrio DIC telah digunakan untuk menciptakan sistem penilaian kualitatif yang digunakan saat ini untuk penilaian/pementasan embrio sapi (komunikasi pribadi, Prof. Matthew Wheeler, UIUC). DIC telah digunakan untuk mempelajari embrio sapi, khususnya untuk mempelajari perkembangan embrio tahap pra-implantasi, untuk mempelajari komponen subseluler seperti tetesan lipid dan pronuklei, untuk mempelajari efek pada media kultur yang berbeda, dan untuk memvisualisasikan prosedur injeksi mikro (Tabel3). Sebagai prosedur yang berdiri sendiri, penggunaan DIC untuk analisis embrio semakin menurun, namun kehadirannya terus berlanjut dalam kombinasi dengan teknik lain dan sistem pencitraan yang lebih kompleks.

Tabel 3. Penerapan mikroskop DIC dalam evaluasi dan analisis embrio sapi.

Penerapan DIC dalam Analisis Embrio Sapi	Sumber
Visualisasi pronuklei	[30]
Evaluasi embrio antara hari ke 4 dan 8 kultur. Evaluasi pembelahan	[31] [32]
Visualisasi tetesan lipid	[33]
Perbandingan embrio tahap 8 sel dalam media kultur berbeda dan visualisasi tetesan lipid sitoplasma	[34]
Visualisasi mikroinjeksi DNA ke dalam pronukleus pria	[35,36]
Pengamatan perkembangan embrio individu Pengamatan tetesan lipid sitoplasma	[37] [38,39]

3.1.3. Mikroskop elektron

Perbesaran maksimum yang dapat dicapai dengan mikroskop cahaya standar umumnya tidak lebih dari 1000×. Sebaliknya, mikroskop elektron memungkinkan pembesaran hingga sekitar 160.000×. Hal ini memungkinkan ultrastruktur seluler divisualisasikan dengan jelas. Dalam hal resolusi, meskipun mikroskop cahaya standar dapat menyelesaikan struktur pada ukuran sekitar 250 nm, kekuatan penyelesaian mikroskop elektron memberikan peningkatan resolusi hampir 1000 kali lipat, hingga mencapai kisaran 0,2 nm [40].

Studi pertama yang meneliti ultrastruktur embrio sapi pra-implantasi dilakukan pada tahun 1978 [41]. Para penulis secara khusus menggunakan pemindaian mikroskop elektron untuk mempelajari penetasan blastokista yang ditemukan*belum menetas*dari sapi 7–10 hari setelah pestrus dan kemudian dibarkan menetas di media kultur in vitro. Banyak penelitian telah dilakukan

dilakukan sejak saat itu untuk mempelajari berbagai aspek embrio sapi pra-implantasi, termasuk struktur organel dalam blastomer [42,43], nukleologenesis blastomer [44–47], siklus sel embrio [48,49], peristiwa yang berhubungan dengan pembuahan (in vitro) dan pembentukan zigot [50], efek vitrifikasi [51], efek dari media kultur yang berbeda pada blastokista IVP [52–54], dan efek kriopreservasi pada blastokista IVD dan IVP [55], dan untuk membandingkan embrio IVD dan IVP [43,56,57].

Sebuah studi yang membandingkan keakuratan penilaian embrio sapi menggunakan stereomikroskopi, mikroskop cahaya, dan mikroskop elektron transmisi (TEM) menemukan bahwa TEM memiliki akurasi yang lebih baik dalam mengidentifikasi blastokista dengan kualitas "baik" dan "sedang" dibandingkan dengan dua jenis lainnya [24]. Namun, temuan ini memiliki nilai minimal dari sudut pandang penerapan praktis dalam industri susu karena penetapan embrio untuk TEM membuat embrio tersebut tidak dapat digunakan. Oleh karena itu, meskipun TEM dapat digunakan sebagai alat penelitian untuk mempelajari perkembangan embrio pra-implantasi, namun manfaatnya kecil untuk prosedur IVF rutin di industri susu [58].

3.1.4. Mikroskop Fluoresensi

Modifikasi mikroskop cahaya lain yang banyak digunakan saat ini dalam penelitian biologi adalah mikroskop fluoresensi [59]. Fluoresensi adalah emisi cahaya oleh suatu zat yang telah menyerap cahaya atau radiasi elektromagnetik lainnya. Bentuk mikroskop ini memanfaatkan kemampuan senyawa berbeda, yang disebut fluorofor, untuk memancarkan cahaya dengan panjang gelombang monokromatik ketika senyawa tersebut menyerap cahaya dengan panjang gelombang energi lebih tinggi. Dengan menggabungkan fluorofor dengan probe molekuler yang dapat mengenali berbagai protein atau jenis molekul biologis lainnya, para peneliti dapat memvisualisasikan dan mengukur keberadaan berbagai molekul biologis yang diinginkan di dalam sel, dan mereka dapat mengamati lokasi dan distribusi berbagai molekul di dalam sel, embrio, dan jaringan untuk mendapatkan wawasan tentang fungsi molekuler dan seluler. Seperti halnya mikroskop cahaya standar, mikroskop fluoresensi memiliki daya resolusi terbatas hingga sekitar 200 nm, dan teknik pelabelan sel dengan probe berpasangan fluorofor biasanya tidak sesuai dengan viabilitas sel. Namun, ada beberapa teknik yang tersedia untuk pencitraan fluoresen sel hidup dan embrio [60].

Mikroskop fluoresen telah digunakan untuk mempelajari berbagai aspek perkembangan embrio sapi pra-implantasi untuk tugas-tugas sederhana, seperti menghitung jumlah blastomer menggunakan DAPI atau pewarnaan nuklir Hoechst [61,62] atau mendeteksi sintesis DNA de novo [63], serta untuk prosedur yang lebih rumit, seperti hibridisasi fluoresen in situ (FISH) untuk mendeteksi kelainan kromosom [63] atau imundeteksi penanda epigenetik H3K9ac dan H3K9m2 [62] dan faktor transkripsi POU5F1 [64].

Teknik mikroskopis fluoresen yang diuraikan di atas menghasilkan gambar embrio datar dua dimensi (2D). Sebaliknya, mikroskop confocal dan mikroskop pemindaian laser multifoton (MPLSM) dapat digunakan untuk menghasilkan gambar 3D embrio, yang mungkin lebih informatif daripada gambar 2D. Seperti halnya mikroskop fluoresensi standar, mikroskop confocal dan MPLSM biasanya digunakan bersama dengan pelabelan fluoresensi spesifik molekul, yang memungkinkan identifikasi dan studi tidak hanya organel dan komponen subseluler (misalnya, tetesan lipid dan mitokondria) tetapi juga intraembrionik dan lokalisasi intraseluler protein/produk gen (misalnya, faktor transkripsi dan penanda spesifik garis keturunan). Selain itu, teknik mikroskopis non-fluoresen yang relatif baru, Gradient Light Interference Microscopy (GLIM), memungkinkan produksi gambar tiga dimensi (3D). Bagian berikut membahas bagaimana teknik mikroskopis 3D ini digunakan dalam studi embrio sapi pra-implantasi.

3.1.5. Mikroskop Konfokal

Meluasnya penggunaan mikroskop fluoresen confocal pada sel dan jaringan dimulai pada akhir tahun 1980an.65,66] karena penerapannya yang luas pada analisis kuantitatif [67]. Dalam mikroskop fluoresensi konvensional, seluruh sampel terkena sumber cahaya eksitasi, dan seluruh sampel memancarkan fluoresensi. Saat diamati di bawah mikroskop dan gambar diperoleh, beberapa sinyal fluoresen yang tidak fokus mengganggu cahaya yang berada dalam fokus.

Selain itu, paparan seluruh sel hidup dan embrio terhadap sumber cahaya ini dapat menyebabkan fototoksisitas, yang mengakibatkan penurunan kelangsungan hidup sel. Melalui penggunaan teknologi pemotongan optik, mikroskop confocal memungkinkan pemaparan dan pengumpulan sinyal fluoresen dari bidang fokus sampel yang relatif sempit. Dengan mengumpulkan gambar bidang fokus di seluruh sampel (biasa disebut z-stacks), gambar tiga dimensi dapat dibuat. Hal ini dapat diterapkan pada embrio tetap atau hidup [67,68]. Masih ada beberapa risiko fototoksisitas karena kekuatan sumber eksitasi dan lamanya waktu pemindaian, namun tantangan ini dapat diminimalkan dengan memilih mikroskop, pengaturan, dan metode pemrosesan sampel yang tepat [68]. Selain itu, embrio sapi mampu mempertahankan kelangsungan hidupnya dengan berhasil mengatasi tingkat fototoksisitas tertentu [69]. Dari berbagai teknik pemotongan optik mikroskopis confocal yang tersedia, sistem confocal disk berputar dianggap sebagai teknik pilihan untuk pencitraan langsung [68,70].

Pemindaian laser confocal telah banyak diterapkan pada sampel tetap dan hidup untuk memvisualisasikan struktur seluler tertentu menggunakan pelabelan fluoresen atau pendekatan bebas label [68]. Pada embrio sapi pra-implantasi, mikroskop confocal telah digunakan untuk berbagai aplikasi, sebagaimana dirangkum dalam Tabel4.

Tabel 4. Penerapan mikroskop confocal dalam evaluasi dan analisis embrio sapi.

Penerapan Mikroskop Confocal dalam Analisis Embrio Sapi	Sumber
Menggunakan pelabelan fluoresen yang ditargetkan	
Pelabelan TUNEL inti apoptosis Lokalisasi	[37,71,72]
intraseluler protein nukleolar Karakterisasi	[44]
zona pelusida Lokalisasi intraseluler Nalp5/	[73]
Mater Studi pola metilasi DNA	[74]
	[75]
Lokalisasi intraseluler IGF1R, IGF2, dan IGF2R	[76]
Lokalisasi intraseluler dari pluripotensi dan penanda spesifik garis keturunan NANOG, OCT4, CDX2, dan GATA6	[77–80]
Pencitraan sel hidup jangka panjang non-invasif dari embrio IVP	[81]
Karakterisasi aktivitas mitokondria dan distribusi tetesan lipid	[82]
Menggunakan pencitraan bebas label	
Deteksi autofluoresensi FAD dan NAD(P)H (untuk menilai status metabolisme)	[83]

3.1.6. Mikroskop Pemindaian Laser Multifoton (MPLSM)

Meskipun mikroskop confocal telah berhasil digunakan untuk pencitraan komponen subseluler, faktor transkripsi, penanda spesifik garis keturunan, dan metabolit embrio sapi, mikroskop ini masih dapat bersifat fototoksik terhadap sel/embrio hidup dan berpotensi membahayakan kelangsungan hidupnya. Sebaliknya, MPLSM dapat digunakan untuk pencitraan penanda fluoresen pada spesimen yang relatif tebal, seperti embrio mamalia, tanpa mengurangi kelangsungan hidupnya.84]. Lebih lanjut, MPLSM dianggap lebih unggul dibandingkan mikroskop confocal untuk memindai spesimen tebal, seperti embrio mamalia, yang menunjukkan sifat hamburan cahaya yang signifikan. Karakteristik MPLSM yang bermanfaat ini terutama disebabkan oleh sistem multifoton yang menggunakan laser inframerah sebagai sumber eksitasinya. Cahaya inframerah memiliki energi yang lebih rendah dan penyebarannya jauh lebih sedikit dibandingkan dengan cahaya dengan panjang gelombang eksitasi yang digunakan dalam mikroskop fluoresensi confocal atau standar [85]. MPLSM telah digunakan untuk menggambarkan organel seluler seperti mitokondria pada blastomer sapi [85]; namun, penggunaannya untuk mempelajari embrio sapi pra-implantasi masih sangat terbatas, kemungkinan karena tingginya biaya peralatan dan kebutuhan akan keahlian teknis [69].

Kelompok kami telah memulai studi pendahuluan menggunakan mikroskop autofluoresensi multiharmonik (SLAM) bebas label simultan [86], yang merupakan platform pencitraan nonlinier sumber eksitasi tunggal untuk menganalisis jalur metabolisme pada embrio sapi (Tu dan Wheeler, 2023, komunikasi pribadi).

3.1.7. Mikroskop Interferensi Cahaya Gradien (GLIM)

Ada dua kekurangan utama dalam banyak teknik mikroskopis yang dibahas sebelumnya. Pertama, pencitraan spesimen optik padat seperti embrio dengan mikroskop konvensional menghasilkan hamburan ganda yang mengacak bidang optik, sehingga menimbulkan mikrograf kontras rendah yang seringkali kurang detail pada tingkat sel [11,87]. Kedua, teknik mikroskopis seperti TEM dan mikroskop fluoresen tidak dapat digunakan untuk menggambarkan embrio hidup.

GLIM dapat digunakan untuk mengatasi kedua kekurangan di atas. Di satu sisi, ini dapat digunakan untuk pencitraan waktu nyata *tebal* embrio, mengatasi banyak hamburan. Di sisi lain, sebagai metode bebas label, GLIM dapat digunakan untuk mencitrakan embrio tanpa mempengaruhi viabilitasnya, sehingga memungkinkan teknologi tersebut digunakan dalam evaluasi embrio sapi yang diproduksi secara in vitro sebelum dibekukan dan/atau dipindahkan [88]. Selain itu, GLIM adalah teknik yang relatif cepat karena memerlukan ~1 menit untuk akuisisi gambar dan >5 menit untuk rekonstruksi virtual gambar. GLIM juga dapat digunakan untuk melacak dan mengikuti pergerakan tetesan lipid, yang mungkin dapat menjadi penanda kualitas embrio [29], karena pergerakan lipid telah dikaitkan dengan pertukaran protein dan lipid antara kompartemen seluler pada embrio spesies tertentu lainnya [89].

GLIM adalah jenis pencitraan fase kuantitatif (QPI) yang menggabungkan mikroskop DIC dengan interferometri koherensi rendah dan holografi. Metode ini dianggap lebih unggul dibandingkan metode QPI lainnya, seperti Spatial Light Interference Microscopy (SLIM), untuk pencitraan sampel optik tebal seperti embrio. GLIM dapat digunakan untuk memperoleh pencitraan tomografi tiga dimensi, cahaya putih, kontras tinggi dari sampel tipis, seperti sel tunggal, dan spesimen yang relatif tebal, seperti embrio sapi. GLIM telah digunakan untuk mendapatkan tumpukan 3D embrio sapi pada berbagai tahap perkembangan selama beberapa hari menggunakan tomografi yang diselesaikan dengan waktu. Dengan menggunakan tomografi GLIM, para peneliti dapat mempelajari masing-masing blastomer, membran plasmanya, celah antara membran plasma blastomer yang berbeda, tetesan lipid dalam blastomer, dll. [58]. Mengingat sifat menguntungkan ini, GLIM mempunyai potensi untuk menjadi alat yang berharga untuk evaluasi embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.

3.1.8. Pemantauan Selang Waktu (TLM)

Teknik mikroskopis yang dijelaskan sebelumnya memungkinkan evaluasi spasial embrio. Namun, perkembangan embrio adalah proses yang dinamis, dan tahap-tahap penting perkembangan mungkin luput dari perhatian dengan penilaian morfologi tradisional yang hanya dilakukan satu kali saja.90]. Berbeda dengan evaluasi morfologi satu kali ini, pemantauan selang waktu (time-lapse monitoring/TLM) memungkinkan embrio untuk dievaluasi secara temporer juga. TLM memfasilitasi studi morfokinetik, memungkinkan korelasi kejadian awal dengan perkembangan selanjutnya dan bahkan hasil akhir kehamilan. Embrio juga dapat diperiksa beberapa kali dengan mikroskop konvensional; namun, evaluasi yang sering dilakukan dapat merugikan embrio karena seringnya penanganan dan paparan terhadap perubahan suhu dan konsentrasi gas. Sebaliknya, TLM memungkinkan pencitraan embrio yang sedang berkembang secara berkala dan non-invasif sambil mempertahankannya *kondisi inkubator*[91].

Laporan pertama mengenai TLM embrio sapi dipublikasikan pada awal tahun 1980an.92,93]. Morula yang dikumpulkan dari tanduk rahim dibiarkan tumbuh dan menetas secara in vitro sambil terus dipantau. Para penulis ini mengamati bahwa ekspansi dan kontraksi pulsatil terjadi *bukan suatu kondisi yang diperlukan* untuk penetasan blastokista sapi, suatu pengamatan yang tidak dapat dilakukan dengan metode konvensional *mikroskop satu kali*. Sejak itu, TLM telah digunakan secara luas untuk mempelajari morfokinetik embrio sapi pra-implantasi, sebagaimana dirangkum dalam Tabel5. Beberapa penelitian mengamati bahwa indikator morfokinetik (MKI), seperti waktu pembelahan pertama, jumlah blastomer pada pembelahan pertama, dan jumlah blastomer pada awal fase lag, dapat digunakan sebagai penanda untuk memprediksi kualitas blastokista dan hasil kehamilan [94,95]. Beberapa bahkan mengusulkan MKI sebagai pengganti yang lebih unggul dari sistem penilaian berbasis morfologi IETS [81].

Studi TLM dari tahun 1980an-2000an sebagian besar menggunakan ruang sinematografi yang ditempatkan pada mikroskop terbalik. Namun, dengan kemajuan teknologi, peralatan pencitraan resolusi tinggi telah diintegrasikan ke dalam inkubator yang [illegible] fungsi penuh, memungkinkan embrio

perekaman yang aman, yaitu TLM (misalnya, Primo Vision, Vitrolife, Goteborg, Swedia, dan Real-Time Cultured Cell Monitoring System dengan Multiple-Point Imaging Capture (CCM-MULTI), Astec, Fukuoka, Jepang). Sistem ini telah berhasil digunakan untuk mempelajari perkembangan embrio sapi pra-implantasi. Mengambil TLM selangkah lebih maju, beberapa penelitian terbaru telah menggunakan mikroskop laser confocal untuk pencitraan sel hidup selang waktu [81] untuk menjelaskan aspek perkembangan embrio sapi baik dalam dimensi temporal maupun spasial. Keuntungan pencitraan empat dimensi (4D) dibandingkan teknik mikroskopis lainnya sangat banyak dan telah ditinjau di tempat lain [96].

Tabel 5. Penerapan pemantauan selang waktu dalam evaluasi dan analisis embrio sapi.

Penerapan TLM dalam Analisis Embrio Sapi	Sumber
Untuk membandingkan interval pembelahan embrio sehat dan embrio yang mengalami degenerasi	[97]
Untuk mempelajari kinetika perkembangan embrio yang berasal dari betis oosit	[98]
Untuk mempelajari efek aktivin A dan follistatin pada kinetika perkembangan	[99]
Untuk mempelajari efek glukosa terhadap kinetika perkembangan embrio pria dan wanita	[100]
Untuk membandingkan kinetika perkembangan embrio IVD dan IVP	[101]
Untuk mempelajari dinamika siklus sel ke-4 yang bertepatan dengan EGA	[102]
Untuk membandingkan kinetika pola pembelahan awal pada embrio yang dapat hidup dan tidak dapat hidup	[103]
Untuk mempelajari perkembangan embrio dalam sistem well-of-the-well (WOW)	[104]
Untuk mengidentifikasi morfokinetik yang dapat memprediksi kualitas blastokista dan outcome kehamilan Untuk	[94]
mempelajari pengaruh pola pembelahan abnormal terhadap morfokinetik dan potensi pertumbuhan Untuk mempelajari	[105]
kinetika perkembangan embrio IVP yang dibuahi dengan semen yang diurutkan berdasarkan jenis kelamin Untuk	[106]
mempelajari morfokinetik pronuklear	[107]
Untuk mempelajari efek dismorfisme pembelahan zigotik pertama pada profil metabolik. Untuk	[108]
mengkorelasikan morfokinetik embrio dengan profil transkriptomiknya	[109]
Untuk mempelajari morfokinetik embrio yang berasal dari oosit sapi yang mengalami vitrifikasi	[90]

Singkatnya, setiap teknik mikroskopis yang telah digunakan untuk mempelajari embrio sapi hingga saat ini memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Metode mikroskopis cahaya konvensional mudah digunakan, relatif murah, dan non-invasif sehingga dapat digunakan tanpa mempengaruhi kelangsungan hidup embrio, bahkan di lokasi dengan fasilitas infrastruktur terbatas. Namun, evaluasi morfologi dengan mikroskop cahaya konvensional mungkin dibatasi oleh perbesaran, resolusi, dan kontrasnya. Di sisi lain, metode mikroskopis berteknologi maju seperti TEM dan mikroskop fluoresen tidak kompatibel dalam menjaga kelangsungan hidup embrio. Oleh karena itu, meskipun teknik ini dapat digunakan untuk mempelajari fisiologi embrio, bahkan pada tingkat molekuler, teknik ini merupakan metode invasif yang tidak memiliki penerapan di dunia nyata dalam mengevaluasi embrio hidup sebelum dibekukan atau dipindahkan. GLIM dapat mengatasi banyak keterbatasan yang dibahas di atas untuk teknik mikroskopis lainnya. Namun, hal ini melibatkan penggunaan peralatan yang sangat canggih dan mahal, karena teknologi ini masih tergolong baru. Demikian pula peralatan pencitraan yang digunakan di TLM juga canggih dan mahal. Oleh karena itu, kecil kemungkinannya teknik-teknik ini akan diadopsi oleh industri susu dan daging sapi pada skala nasional dan global saat ini.

3.2. Analisis Non-Mikroskopis

3.2.1. Diagnosis Genetik Pra-Implantasi (PGD)

Istilah Diagnosis Genetik Pra-implantasi (PGD) diciptakan pada akhir tahun 1980an [110] untuk menjelaskan prosedur pengujian biopsi sel embrio *mendiagnosis* suatu sifat genetik. Namun, prosedur serupa telah dilakukan sejak tahun 1968 ketika blastokista kelinci tahap pra-implantasi berumur 5-6 hari ditentukan jenis kelaminnya melalui identifikasi mikroskopis dari sel-sel tersebut. *kromatin seks* dalam sel trofoblas yang dibiopsi [111]. Faktanya, hingga awal tahun 1990-an, sebagian besar bersifat genetik *diagnosa* embrio pra-implantasi ditujukan untuk penentuan jenis kelamin karena mentransfer embrio betina yang sudah diketahui akan memberikan banyak manfaat bagi industri peternakan [112]. Hal ini sangat penting dalam *era air mani pra-sexed*, dimana penentuan jenis kelamin embrio merupakan satu-satunya pilihan yang layak jika embrio IVD atau IVP akan ditentukan jenis kelaminnya sebelum digunakan dalam berbagai program transfer embrio ternak.

Studi awal tentang jenis kelamin embrio embrio sapi pra-implantasi yang terlibat dalam chimerism [113], atau [illegible] [113,114]. Namun, dengan [illegible]

reaksi berantai polimerase (PCR; [115]), ini menjadi metode pilihan untuk penentuan jenis kelamin dan analisis genetik pra-implantasi lainnya. Sexing berbasis PCR pertama pada embrio sapi pra-implantasi dilakukan pada awal tahun 1990an dengan menggunakan DNA yang diekstraksi dari blastomer tunggal yang dibiopsi dari morula 16-32 sel [116]. Penelitian serupa diikuti, dengan biopsi blastomer dari 8 hingga 16 sel [117] dan morula sapi dengan 16 hingga 32 sel [118] dan biopsi sel trofoblas dari blastokista sapi [119]. Studi terkait embrio sapi pertama yang memanfaatkan PCR untuk tujuan nonsexing mempelajari dinamika ekspresi temporal gen gap persimpangan *Cx43* [120]. Sejak itu, PCR (terutama PCR kuantitatif waktu nyata) telah digunakan secara luas untuk mempelajari berbagai aspek embrio sapi pra-implantasi, termasuk EGA [80,121], spesifikasi garis keturunan awal [80,122], dan efek superovulasi pada embrio [123], dan untuk memvalidasi data ekspresi gen dari lusinan, bahkan ratusan, studi microarray dan RNA-seq.

Prasyarat penting untuk keberhasilan PGD adalah perlunya melakukan biopsi embrio tanpa mempengaruhi viabilitas/kompetensi embrio. Seperti yang diulas di tempat lain, tingkat kebuntingan sebesar 31-63% diperoleh oleh kelompok yang berbeda setelah mentransfer embrio sapi pra-implantasi yang dibiopsi [124]. Hanya segelintir penelitian yang secara langsung membandingkan tingkat kehamilan akibat transfer embrio yang dibiopsi dan embrio utuh. Salah satu dari mereka mengamati penurunan sebesar ~15% pada tingkat kehamilan ketika mentransfer blastokista yang dibiopsi, sementara yang lain tidak (Tabel 6). Kurangnya kesepakatan antar penelitian dapat disebabkan oleh kondisi yang berbeda-beda di antara penelitian, seperti jumlah blastomer yang dibiopsi, lama kehamilan pada saat tes kehamilan, dan variasi di antara penerima.

Tabel 6. Perbandingan angka kebuntingan akibat transfer embrio sapi yang dibiopsi dan yang tidak dibiopsi.

Sumber	Jenis Embrio	Jumlah Embrio	Tingkat Kehamilan (PR)	Pengamatan
Mullaart dan Wells, 2018 [125]	Biopsi (IVD)	1190	46%	PR berbeda pada 5 bulan (P<0,05)
	Utuh (IVD)	13.067	54%	
de Sousa, da Silva Cardoso, 2017 [126]	Biopsi (IVD)	380	54%	PR tidak berbeda pada 60 hari (P>0,05)
	Utuh (IVD)	229	56%	
	Biopsi (IVP)	91	26%	PR tidak berbeda pada 60 hari (P>0,05)
	Utuh (IVP)	227	20%	
Fisher, Hyndman, 2012 [127]	Biopsi (IVP)	42	43%	PR tidak berbeda pada 65 hari (P>0,05)
	Utuh (IVP)	42	38%	

3.2.2. Analisis Embrio Berbasis Omics

PGD dilaksanakan untuk *mendiagnosis* sifat tertentu yang menarik (misalnya, jenis kelamin, kelainan kromosom, atau penyakit genetik, khususnya pada manusia). Sebaliknya, dengan kemajuan dalam "omics", embrio pra-implantasi dapat disaring untuk seluruh genom (juga dikenal sebagai skrining genom/genetik pra-implantasi: PGS), transkriptom, epigenom, proteom, dan metabolom. Alat-alat ini dapat memberikan wawasan kuantitatif dan akurat secara statistik tidak hanya tentang segelintir molekul tetapi ratusan, bahkan ribuan, biomarker potensial. Data dalam jumlah besar ini juga dapat digunakan untuk memahami hubungan fungsional di antara yang teridentifikasi *penanda*, yaitu, di jalur/jaringan seluler [128,129]. Oleh karena itu, penelitian terkait omics telah dilakukan secara ekstensif selama tiga dekade terakhir untuk mencari tes standar emas untuk evaluasi embrio sebelum transfer dan dalam upaya untuk lebih memahami perkembangan embrio pra-implantasi. Bagian berikut ini mengkaji berbagai jenis penelitian yang telah dilakukan di "omics" terkait embrio sapi pra-implantasi.

Studi Genomik

Seleksi genom banyak digunakan dalam produk susu [130] dan daging sapi [131] program pemuliaan hari ini. Nilai perkiraan pemuliaan genom (GEBVs) saat ini dihitung setelah kelahiran anak sapi [132]. Praktik ini menciptakan tingkat tertentu *pemborosan* dalam bentuk anak sapi yang tidak memenuhi kriteria genetik minimum/GEBV yang diharapkan dan semua sumber daya yang telah digunakan untuk menghidupkan anak sapi tersebut, misalnya induk/ibu pengganti yang melahirkan anak tersebut. Pemborosan ini dapat diminimalkan dengan menggunakan skrining genomik pra-implantasi (PGS) untuk menyaring blastokista untuk mengetahui sifat-sifat kesehatan, produksi, dan reproduksi yang menguntungkan sebelum dideteksi.

transfer ke penerima [125,133,134]. Pendekatan seperti ini akan memungkinkan transfer embrio terbaik saja, tidak hanya menghindari pemborosan yang telah disebutkan sebelumnya tetapi juga meningkatkan intensitas seleksi dan memperpendek interval generasi, sehingga menghasilkan perolehan genetik yang lebih cepat [124, 125,132]. Aplikasi PGS secara komersial dalam skala besar kini dimungkinkan karena ketersediaan chip polimorfisme nukleotida tunggal (single-nucleotide polymorphism/SNP) yang terjangkau.124,132,135] dan GEBV dengan keandalan mendekati 70% [125].

Studi genom menggunakan genotipe SNP telah dilakukan pada embrio sapi pra-implantasi terutama untuk menguji aneuploidi [132,135–137], penyimpangan kromosom [136,138], dan pemetaan karyoma [135,139] hingga saat ini. Setelah mengidentifikasi embrio euploid untuk ditransfer (dari embrio IVP yang dipetakan secara karyo), anak sapi hidup dilahirkan, menunjukkan bahwa studi genomik/SNP memang memiliki penerapan di tingkat dasar [135].

Microarray untuk Profil Transkriptome

Evaluasi genetik embrio pra-implantasi yang dimulai dalam bentuk PGD berevolusi menjadi metode throughput tinggi yang dapat dengan cepat menyaring seluruh transkriptom sekitar awal abad ke-21. Studi transkriptom yang luas ini tidak hanya memungkinkan studi ribuan gen secara bersamaan tetapi juga membantu memahami patofisiologi yang mendasarinya secara biologis dengan mengidentifikasi jalur atau jaringan biologis yang dipengaruhi secara berbeda antar kelompok sampel.129].

Studi transkriptome pertama yang melibatkan embrio sapi dilakukan dengan menggunakan hibridisasi supresi-subtraktif (SSH) pada tahun 2002-2004 [140,141]. Studi microarray pertama pada embrio sapi dilaporkan pada tahun 2004 [142]. Kelompok peneliti membandingkan transkriptom blastokista IVD dan IVP menggunakan microarray sapi yang dibuat khusus. Dekade berikutnya terlihat beberapa lusin penelitian microarray dilakukan untuk mempelajari berbagai aspek perkembangan embrio sapi pra-implantasi menggunakan beberapa produk komersial dan komersial.*buatan sendiri*platform microarray cDNA dan oligonukleotida (Tabel7).

Tabel 7. Penerapan teknologi microarray dalam evaluasi dan analisis embrio sapi.

mikroarray **Platform yang Digunakan**	**Tujuan Studi**	**Sumber**
Mikroarray cDNA sapi dikembangkan secara internal	Untuk membandingkan blastokista IVD dan IVP	[142,143]
Microarray cDNA BlueChip, Universite Laval, Quebec, Kanada	Untuk membandingkan embrio 2 sel yang diturunkan secara in vivo, embrio 8 sel, blastokista, dan oosit GV	[144]
	Untuk menemukan gen yang akan memprediksi nasib embrio pasca transfer	[145,146]
	Untuk mempelajari pengaruh lingkungan mikro embrio menggunakan sistem well-of-the-well (WOW).	[147]
	Untuk membandingkan tahap pra-implantasi IVD dan IVP (tahap 2, 4, dan 8 sel, morula, dan blastokista)	[148]
	Untuk membandingkan blastokista yang berasal dari IVP dan partenogenesis	[149]
GeneChip Affymetrix®Bovine Genome Array, CA, AS	Untuk mempelajari efek regulator metabolik pada blastokista Untuk menguji efek dari media kultur yang berbeda pada embrio IVP Untuk mempelajari dinamika transkriptomik pada EGA (tahap 8 sel) Untuk mengidentifikasi pola ekspresi spesifik tahap pada perkembangan in vivo 2-sel, 4-sel , dan tahapan 8 sel serta morula dan blastokista	[150] [151] [152] [153]
	Untuk mempelajari efek peningkatan progesteron pada perkembangan blastokista	[154]
	Untuk membandingkan blastokista IVP yang mengalami degenerasi dan tampak sehat Untuk mempelajari pola ekspresi gen blastokista yang spesifik jenis kelamin Untuk mengidentifikasi sidik jari transkriptome sebagai prediktor keberhasilan kehamilan setelah ET	[155] [156] [157]
	Untuk mempelajari efek superovulasi pada perkembangan embrio Untuk mempelajari transisi dari blastokista berbentuk bola ke konseptus berbentuk bulat telur	[158] [159]
	Untuk mempelajari efek pengatur metabolisme pada blastokista Untuk mempelajari spesifikasi garis keturunan sel blastokista	[150] [160]

Tabel 7.*Lanjutan*

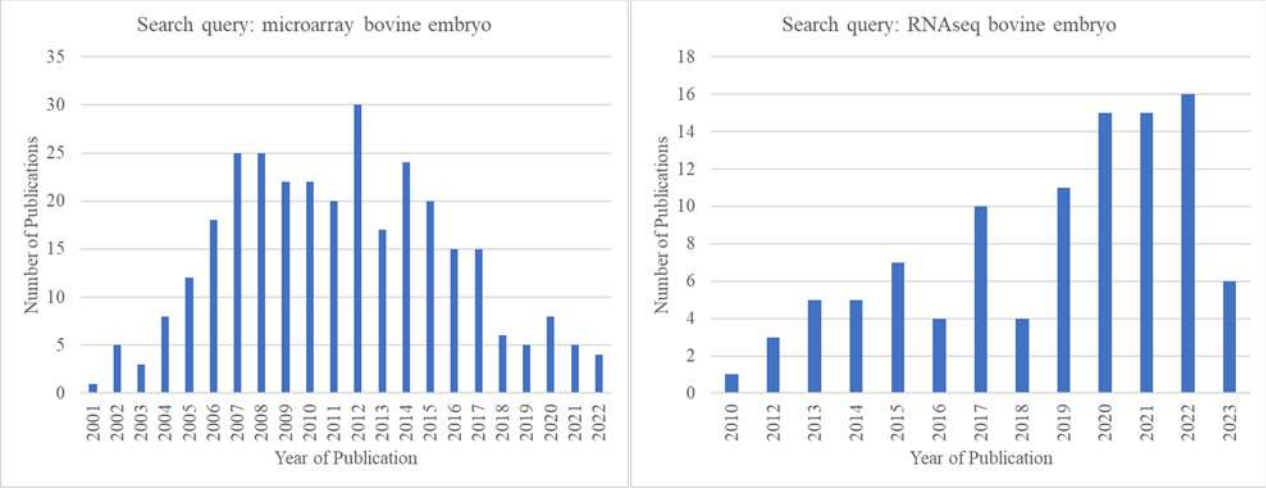
mikroarray Platform yang Digunakan	**Tujuan Studi**	**Sumber**
EmbryoGENE Bovine Microarray, Agilent, CA, AS	Untuk mempelajari EGA dan pengaruh kondisi kultur in vivo dan in vitro pada perkembangan awal embrio	[161]
	Untuk mempelajari efek stres hiperglikemik pada blastokista IVP	[162]
	Untuk mempelajari efek stres oksidatif pada blastokista IVP Untuk membandingkan ICM dan TE antara embrio IVP dan IVD Untuk mempelajari efek konsentrasi asam lemak non-esterifikasi (NEFA) pada blastokista	[163] [164] [165]
	Untuk membandingkan efek vitrifikasi dan pembekuan lambat pada morula dan blastokista	[166]
	Untuk mempelajari efek usia banteng pada blastokista	[167]
	Untuk mengidentifikasi prediktor transkriptomik hasil kehamilan Untuk mempelajari efek paparan perfluorooctane sulfonate (PFOS) pada oosit sapi terhadap perkembangan embrio awal	[168] [169]
	Untuk memodelkan tanda tangan gen yang memprediksi kelangsungan hidup embrio	[170]
Ekspresi gen sapi microarray V2, Agilent, CA, AS	Untuk mempelajari profil transkriptomik terkait dengan pluripotensi sapi	[171]
3995 microarray cDNA sapi dikembangkan sendiri	Untuk mempelajari perubahan temporal selama tahap perkembangan peri-implantasi (embrio berusia 7–28 hari)	[172]
7872 microarray cDNA sapi yang dikembangkan oleh University of Illinois, Urbana-Champaign	Untuk membandingkan blastokista yang diturunkan dari IVD dan transfer inti sel somatik (SCNT).	[173]
2640 microarray cDNA sapi dikembangkan sendiri	Untuk membandingkan blastokista turunan IVP dan SCNT	[174]
5000 microarray cDNA sapi dikembangkan sendiri	Untuk membandingkan blastokista turunan IVP dan SCNT	[175]

Dalam beberapa penelitian ini, RNA diekstraksi dari seluruh embrio [142–144], menjadikannya pendekatan yang tidak berguna untuk evaluasi embrio pra-transfer. Meskipun demikian, penelitian tersebut masih berguna untuk mempelajari lebih lanjut perkembangan embrio pra-implantasi dari sudut pandang penelitian. Namun, banyak penelitian microarray lainnya telah dilakukan dengan mengekstraksi RNA dari biopsi ~30–40% embrio utuh. Dalam salah satu penelitian tersebut, sisa 60-70% embrio dibiarkan berkembang secara in vitro, dan hasil demi-blastokista dipindahkan ke penerima. Tingkat kehamilan 30% dicapai dalam penelitian ini. Selanjutnya dengan membandingkan transkriptom blastokista yang berhasil melahirkan hidup *vs.* mereka yang tidak, mereka menemukan kandidat gen potensial yang berhubungan dengan hasil kehamilan pasca transfer [145,146]. Tanda tangan ekspresi gen tersebut dapat berfungsi sebagai penanda untuk mengevaluasi embrio pra-transfer. Oleh karena itu, teknologi microarray memang berpotensi untuk digunakan dalam evaluasi pra-transfer embrio di industri susu dan daging sapi.

Dengan munculnya teknologi pengurutan RNA (RNA-seq), pendekatan pembuatan profil transkripsi lebih unggul daripada microarray dalam banyak hal [176,177], popularitas microarray secara bertahap mulai menurun. Tampaknya ada pergeseran nyata ke RNA-seq dari microarray mulai tahun 2012, bahkan di antara mereka yang terlibat dalam penelitian embrio sapi pra-implantasi. Hal ini jelas tercermin dalam catatan publikasi di Dipublikasikan.gov (Angka 3).

Urutan RNA (RNA-Seq) untuk Profil Transkriptome

Studi RNA-seq pertama pada embrio sapi dilakukan pada tahun 2010 untuk membandingkan transkriptom dari *tampak sehat* Dan *merosot* Blastokista IVP menggunakan platform Genome Analyzer oleh Illumina [178]. Sejak itu, beberapa lusin penelitian RNA-seq telah dilakukan untuk mempelajari berbagai aspek perkembangan embrio sapi pra-implantasi menggunakan beberapa platform yang tersedia secara komersial (Tabel 8). Beberapa dari penelitian ini menggunakan kumpulan RNA [25,178–180], beberapa menggunakan RNA dari embrio individu [181,182], dan lainnya menggunakan RNA dari biopsi embrio [183,184], termasuk dari blastomer tunggal [185,186]. Namun, mengekstraksi RNA dalam jumlah kecil dari sel tunggal akan memerlukan amplifikasi RNA, yang dapat menyebabkan komplikasi yang tidak diinginkan.



Gambar 3. Perbandingan jumlah publikasi yang diidentifikasi diDipublikasikan.gov(https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/, diakses pada 15 Mei 2023) berdasarkan tahun untuk kueri penelusuran "microarray bovine embrio" dan "RNA-seq bovine embrio" yang menunjukkan bahwa setelah tahun 2012, publikasi terkait microarray menurun, dan publikasi terkait RNA-seq meningkat.

Tabel 8. Penerapan teknologi sekuensing RNA dalam evaluasi dan analisis embrio sapi.

RNA-Seq Platform yang Digunakan	**Tujuan Studi**	**Sumber**
Penganalisis Genom, Illumina, CA, AS	Untuk membandingkan blastokista IVP yang tampak sehat dan yang mengalami degenerasi	[178]
	Untuk mempelajari pengenalan dan implantasi ibu menggunakan embrio sapi berumur 7, 10, 13, 16, dan 19 hari	[179]
	Untuk mempelajari EGA menggunakan tahapan 4 sel, 8 sel, 16 sel, dan blastokista	[180]
	Untuk menunjukkan bahwa RNA-seq dapat dilakukan dengan menggunakan RNA yang diekstraksi dari blastokista individu	[181]
	Untuk mengidentifikasi microRNA (miRNA) dalam media kultur embrio dengan kompetensi perkembangan yang berbeda	[187]
HiSeq 1500TM sistem, menerangi, CA, AS	Untuk mempelajari fungsi gen spesifik garis keturunan *Oktober 4* (dengan melumpuhkannya menggunakan sistem CRISPR/Cas-9)	[79]
	Untuk mempelajari EGA menggunakan single-blastomer RNA-seq	[186]
	Untuk mempelajari peran *Oktober 4* pada diferensiasi garis keturunan kedua	[188]
HiSeq 2000TMsistem, Illumina, CA, AS	Untuk membandingkan blastokista IVD dan IVP yang serupa secara morfologi.	[25]
	Untuk menunjukkan bahwa RNA-seq dapat dilakukan dengan menggunakan RNA yang diekstraksi dari "biopsi" sel ICM dan TE tunggal	[189]
	Untuk mempelajari kontribusi genetik ayah pada blastokista IVP pra-implantasi	[190]
HiSeq 2500TMsistem, Illumina, CA, AS	Untuk mempelajari ekspresi miRNA dalam zigot	[191]
HiSeq 3000TMsistem, Illumina, CA, AS	Untuk menguji efek DKK1 (antagonis WNT) selama tahap morula dan blastokista	[192]
HiSeq 4000TMsistem, Illumina, CA, AS	Untuk mempelajari kontribusi genetik ayah dalam blastokista IVD pra-implantasi	[193]
BerikutnyaSeqTMsistem, Illumina, CA, AS	Untuk mengidentifikasi tanda tangan transkriptomik yang memprediksi pembentukan dan pemeliharaan kehamilan	[183,184]
	Untuk mempelajari peristiwa remodeling kromatin selama EGA	[194]
HiSeq X SepuluhTMsistem, Illumina, CA, AS	Untuk mempelajari kontribusi RNA dari pihak ayah (RNA yang diturunkan dari sperma) pada embrio pra-EGA (2-sel dan 4-sel)	[195]
	Untuk mengetahui peran remodeler kromatin SMARCA5 dalam blastokista	[196]
	Untuk menentukan peran jalur pensinyalan NOTCH dalam perkembangan embrio awal	[197]
	Untuk mempelajari regulasi translasi spatiotemporal selama pengembangan pra-implantasi	[198]

Tabel 8. *Lanjutan*

RNA-Seq Platform yang Digunakan	Tujuan Studi	Sumber
NovaSeq6000™sistem, Illumina, CA, AS	Untuk mempelajari ekspresi gen terkait metabolisme lipid pada embrio partenogenetik	[199]
	Untuk mempelajari konsekuensi fungsional dari tiga gen spesifik garis keturunan yang kritis (*SOX2*, *Oktober 4*, Dan *CDX2*) menentukan jenis kelamin embrio	[182] [200]
Penganalisis Genetik 5500xl, Biosistem Terapan, CA, AS	Untuk membandingkan embrio 2 sel hingga 16 sel serta morula awal dan blastokista dengan embrio manusia dan tikus	[201]
	Untuk mengukur kelimpahan transkrip gen yang dicetak Untuk mendeteksi potensi perkembangan embrio dengan RNA-seq blastomer tunggal	[202] [185]

Mentransfer 12 demi-embrio yang tersisa setelah biopsi untuk ekstraksi RNA, Zolini, Block, 2020 [183], mencapai 5 kehamilan (41,7%) pada usia kehamilan 60 hari, menunjukkan bahwa blastokista yang diuji dengan RNA-seq memang dapat digunakan untuk evaluasi pra-transfer embrio sapi.

Proteomik

Proteom embrionik umumnya dianggap mencerminkan dinamika embrio yang sebenarnya lebih baik daripada transkriptom karena dua alasan. Pertama, protein, metabolit, dan molekul kecil lainnya biasanya menjadi pemain terakhir dalam peristiwa seluler/fisiologis. Sebaliknya, transkrip biasanya merupakan pemain perantara. Kedua, embrio diam secara transkripsi selama beberapa pembelahan pertama hingga EGA terjadi. Selama fase ini, perkembangan embrio terutama dikendalikan oleh RNA dan protein yang berasal dari oosit.203,204]. Berbeda dengan metode evaluasi embrio yang relatif invasif yang telah dibahas sebelumnya (misalnya genomik, transkriptomik, dan bahkan jenis mikroskop tertentu), studi proteomik dapat dilakukan secara relatif non-invasif dengan menganalisis sekresi embrio yang terdapat dalam media kultur.

Analisis protein embrio pra-implantasi telah dilakukan untuk mempelajari spesifikasi garis keturunan awal [204], EGA [203], dinamika proteom spesifik tahap selama pengembangan praimplantasi [203,205], perbedaan antara embrio IVP dan IVD [206], proteom cairan blastocoel [207], cairan kantung kuning telur primitif [208], dan trofektoderm [209], dan untuk mengidentifikasi faktor embriotrofik dalam sekretom yang dapat berfungsi sebagai biomarker embrio berkualitas tinggi [210].

Secara tradisional, pembuatan profil proteomik dilakukan menggunakan elektroforesis gel 2D dan Western blotting. Namun, penelitian modern menggunakan berbagai teknologi berbasis spektrometri massa, seperti Ionisasi Desorpsi Laser Berbantuan Matriks – Spektrometri Massa Waktu Penerbangan (MALDI-TOF MS), Kromatografi Cair dengan Spektrometri Massa Tandem (LC-MS-MS).), Kromatografi Nanoliquid Ditambah dengan Spektrometri Massa Tandem (nanoLC-MS/MS), dan Spektrometri Massa Tandem Nano-HPLC.

Profil Metabolik

Metabolom adalah representasi hilir dari transkriptome dan proteom karena metabolit adalah produk akhir dari fungsi seluler yang dimediasi oleh transkriptome dan proteom. Dengan demikian, hubungan yang kuat telah diamati antara fisiologi embrio dan profil metaboliknya, mendorong para peneliti untuk mengembangkan biomarker berbasis metabolomik. Mirip dengan proteomik, profil metabolik embrio pra-implantasi dapat dianalisis dengan cara yang sangat non-invasif, menjadikannya alat yang ampuh untuk evaluasi embrio pra-transfer atau pra-kriopreservasi. Profil metabolisme suatu metabolit tertentu dapat diukur sebagai jumlah (i) yang dikonsumsi/diserap atau (ii) yang dilepaskan oleh embrio. Evaluasi lingkungan mikro embrio, yaitu media kultur bekas, dapat memberikan gambaran yang cukup akurat dari kedua pengukuran di atas untuk metabolit individu atau keseluruhan metabolom [10,23,211].

Laporan pertama mengenai pengukuran metabolit pada blastokista sapi dimulai pada tahun 1988 [212] ketika tim peneliti mengukur glukosa, piruvat, dan glutamin, substrat yang terkait dengan metabolisme energi. Studi awal pada tahun 1980an dan paruh pertama tahun 1990an berfokus pada substrat yang berhubungan dengan metabolisme energi, seperti glukosa, piruvat, dan glutamin. Belakangan, para peneliti juga mempelajari oksigen sebagai indikator aktivitas metabolisme secara keseluruhan sebagai pembangkitan energi sel *melalui* fosforilasi oksidatif mitokondria bergantung pada oksigen [213,214]. Selama dekade terakhir, banyak kandidat lain telah diidentifikasi dan diuji oleh berbagai kelompok penelitian (Tabel 9).

Selama era sebelum tahun 2000, sebagian besar uji fluorometri atau HPLC fase terbalik digunakan untuk mengukur metabolit individu, seperti glukosa, laktat, piruvat [215], dan asam amino [216]. Selain itu, alat seperti nanorespirometer (untuk mengukur konsumsi oksigen; [217]), embrioskop dengan mikrosensor oksigen bawaan (untuk mengukur konsumsi oksigen; [218]), sensor REDOX (untuk mengukur produksi ROS; [218]), dan sistem multi-sensor yang dapat mengukur konsentrasi oksigen, glukosa, dan laktat secara bersamaan [219] juga telah dikembangkan/digunakan untuk mengevaluasi profil metabolisme embrio sapi.

Dengan perkembangan besar-besaran dalam teknologi biomedis, teknik ini digantikan oleh metabolomik berbasis spektrometri massa (MS), yang memungkinkan deteksi massal metabolit, yaitu metabolom, secara bersamaan (misalnya >10.000 metabolit; [220]). Proses ini biasanya terdiri dari dua langkah: pemisahan menggunakan kromatografi, diikuti dengan deteksi menggunakan MS. Contoh metodologi yang digunakan hingga saat ini adalah Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi – Spektrometri Massa Waktu Penerbangan (UHPLC-TOF MS; UHPLC-TOF MS; [220,221]), Spektrometri Massa Waktu Penerbangan Quadrupole Kromatografi Gas (GC-qTOF; [12]), Spektroskopi Inframerah Transformasi Fourier (FTIR; [222]), dan Spektroskopi Raman [223]. Selain teknik berbasis MS, resonansi magnetik nuklir resolusi tinggi (^{1}H NMR) spektroskopi [224,225] juga telah digunakan untuk studi metabolomik embrio sapi pra-implantasi.

Metabolomik telah digunakan tidak hanya untuk mengidentifikasi penanda viabilitas embrio sapi tetapi juga untuk menentukan jenis kelamin embrio [220–222,224,226].

Tabel 9. Metabolit dianalisis dalam embrio sapi.

Metabolit yang Dianalisis atau Indikator Metabolisme	Sumber/s
Glukosa	[212,215,227–230]
Piruvat	[212,215,225,228,229,231] [
Laktat	215,224,225,229,231]
Asam amino	[212,216,220,221,224–229,231–233] [
Asam lemak	221,234,235] [217,218,229,236] [218]
Oksigen	
Spesies oksigen reaktif (ROS)	
Myo-inositol	[224,231]
Garam sitrat	[224,231,233] [
Format	224,231]
Prostaglandin	[221]
Biotin	[220]

3.2.3. Resonansi Magnetik Nuklir (NMR)

Resonansi magnetik nuklir (NMR) digunakan secara luas di rumah sakit dan pusat penelitian untuk prosedur diagnostik in vivo non-invasif (misalnya, umumnya dikenal sebagai pemindai MRI). Berbeda dengan radiasi pengion sinar-X dan tomografi komputer (CT scan), yang dapat berbahaya bagi sel hidup, radiasi non-pengion NMR dianggap tidak berbahaya atau minimal berbahaya bagi sel hidup dan oleh karena itu dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur penanda penting secara biologis dalam sel utuh, embrio, ekstrak, atau sekretom [237,238]. Faktanya, beberapa kelompok penelitian telah menggunakan spektroskopi NMR untuk menemukan biomarker berbasis metabolik yang dapat memprediksi jenis kelamin janin dan perkembangan embrio [224,225,227,228]. Setelah biomarker [illegible]

diidentifikasi oleh NMR, pengujian enzimatik sederhana dapat dikembangkan untuk mengidentifikasi/mengukur penanda tersebut tanpa memerlukan peralatan NMR yang canggih [237]. Dengan demikian, terdapat potensi besar bagi biomarker metabolik, yang diidentifikasi dengan NMR atau cara lain, untuk memiliki aplikasi praktis dalam evaluasi embrio non-invasif di industri ET sapi.

Penerapan NMR terkait ART, termasuk yang digunakan untuk evaluasi embrio, telah ditinjau secara rinci di tempat lain [237].

3.2.4. Alat yang Kurang Umum Digunakan

Selain metode yang dijelaskan di atas, embrio sapi pra-implantasi juga telah dipelajari dengan menggunakan berbagai alat lain (Tabel10).

Tabel 10. Berbagai alat/teknik yang digunakan untuk menganalisis embrio sapi.

Penanda Terukur/Metodologi	Peralatan/Metodologi yang Digunakan	Sumber/s
Apoptosis	uji TUNEL	[71,239,240], diperiksa oleh [241]
Profil ribosom	Fraksinasi ribosom resolusi tinggi, profil polisom, RNA-seq	[198]
Lanskap metilasi DNA	Antibodi anti-5-methylcytosine (5-MeC), analisis peleburan resolusi tinggi yang sensitif terhadap metilasi (MS-HRM), urutan bisulfit	[75,242–248]
lokalisasi mRNA	Hibridisasi in situ	[63,80,249,250]
Kelainan kromosom	Pewarnaan Giemsa 5% (1250× pembesaran)	[251]
Mikroskop berbasis otomasi/ kecerdasan buatan (AI).	Penggunaan algoritme genetika, jaringan saraf tiruan, ekstraksi fitur otomatis dari gambar, dan pembelajaran yang diawasi merumuskan sistem penilaian berbantuan komputer (CASS)/model prediktif berbasis AI	[1,252–256]
Penghancuran gen	Pengeditan basis sitosin, pengeditan gen CRISPR/Cas-9, penghancuran gen yang dimediasi siRNA	[79,182,196,197,257]
Karakterisasi vesikel ekstraseluler	Analisis pelacakan nanopartikel, mikroskop elektron, sekuensing RNA kecil	[258–260]
Pendekatan multi-omics	Mengintegrasikan data transkriptomik dan epigenetik serta mengintegrasikan data metabolomik dan epigenetik	[261,262]

4. Diskusi

Hampir 1,5 juta embrio sapi ditransfer pada tahun 2021. Dari transfer tersebut, hampir 80% (~1,2 juta) melibatkan embrio IVP [2]. Meskipun terdapat kemajuan besar dalam setiap aspek IVP, hanya ~27% dari IVP yang diharapkan dapat menghasilkan anak sapi hidup [4]. Meskipun penyebab kegagalan kehamilan bersifat multifaktorial, sebagian masalahnya adalah perpindahan embrio berkualitas rendah secara tidak sengaja karena ketidakmampuan kita dalam membedakan secara akurat embrio berkualitas tinggi dan embrio berkualitas rendah. Metode pilihan saat ini untuk evaluasi embrio, yaitu evaluasi morfologi menggunakan stereomikroskop, dianggap subjektif dan memiliki akurasi dan reproduktifitas yang buruk [1,5]. Penelitian selama lebih dari dua dekade telah dilakukan untuk menemukan alat pengganti evaluasi morfologi manual, namun belum ada hasil nyata yang dapat diadopsi di tingkat dasar.

4.1. Teknik Mikroskopis

Dari metodologi visualisasi yang dibahas, stereomikroskopi adalah alat yang paling umum digunakan untuk evaluasi pra-transfer/pra-kriopreservasi kualitas embrio/blastokista sapi. Namun, metodologi ini terkendala oleh subjektivitas manusia dan akurasi yang buruk.

Mikroskop elektron dan mikroskop fluoresen telah memberikan kontribusi besar terhadap pengetahuan terkini tentang ultrastruktur embrio sapi pra-implantasi dan lokalisasi mRNA dan protein intraembrionik/intraseluler (melalui IKAN, imunositokimia, dll.). Namun, karena prosedur persiapan sampel membuat embrio tidak dapat hidup, keduanya merupakan teknik invasif yang tidak berguna untuk evaluasi embrio hidup.

GLIM lebih unggul daripada teknik mikroskopis yang disebutkan di atas karena bebas label dan non-invasif serta menangkap gambar 3D embrio tebal secara real-time, sehingga mengatasi banyak hamburan. Selain itu, diperlukan ~1 menit untuk akuisisi gambar dan <5 menit untuk rekonstruksi virtual gambar. Dengan demikian, GLIM dapat digunakan untuk evaluasi embrio hidup tanpa mempengaruhi kelangsungan hidupnya. Namun, peralatan tersebut mahal dan canggih serta memerlukan keahlian teknis tingkat tinggi untuk mengoperasikannya. Oleh karena itu, kemungkinan besar penerapan praktisnya pada industri susu atau sapi potong tidak akan terjadi dalam waktu dekat.

TLM memungkinkan evaluasi temporospasial embrio dan dengan demikian dapat digunakan untuk mempelajari morfokinetika embrio. Beberapa MKI yang dapat memprediksi viabilitas/kualitas embrio telah ditemukan menggunakan TLM; namun, prosedur ini memerlukan embrio untuk dikultur dan dilacak secara individual menggunakan peralatan pencitraan yang mahal. Oleh karena itu, betapapun kuatnya alat tersebut, kemungkinan besar TLM juga tidak akan diadopsi oleh masyarakat luas dalam waktu dekat.

4.2. Teknik Non-Mikroskopis

Metodologi berbasis omics yang paling umum digunakan untuk mempelajari perkembangan embrio sapi praimplantasi hingga saat ini berkaitan dengan transkriptomik dan metabolomik. Relatif sedikit penelitian yang telah dilakukan menggunakan SNP, proteomik, dan epigenomik. Tidak ada keraguan bahwa banyak dari teknologi “omics” yang dibahas telah berhasil menemukan penanda viabilitas/kualitas embrio. Namun, ketika menyangkut penerapan teknologi ini di lapangan, lebih banyak pertanyaan yang diajukan daripada jawaban. Misalnya, jika transkriptomik diadopsi untuk evaluasi embrio di lapangan, apakah realistis untuk melakukan biopsi dan mengekstraksi RNA dari 2 juta embrio (perkiraan produksi embrio sapi tahunan) dan kemudian menjalankan 2 juta mikroarray/RNA-seq? Apakah langkah-langkah ini akan dilakukan di fasilitas produksi/pengumpulan embrio? Atau apakah embrio akan diangkut ke fasilitas lain? Jika diangkut keluar, embrio mungkin perlu dibekukan untuk diangkut dan dicairkan sebelum pengujian. Karena akan ada selang waktu beberapa hari antara biopsi dan ketersediaan hasil setelah analisis bioinformatik, embrio perlu dibekukan kembali, dan embrio yang akan*lulus ujian*perlu dicairkan kembali sebelum ET. Telah diketahui secara luas bahwa pembekuan dan pencairan, apalagi pembekuan ulang dan pencairan ulang, dapat menimbulkan efek yang tidak diinginkan pada kualitas/ kelangsungan hidup embrio [263]. Dibandingkan dengan pengujian transkriptomik, proteomik dan metabolomik dianggap non-invasif karena media kulturlah yang dianalisis dan bukan embrio.*sendiri*. Namun, hal ini memerlukan embrio yang dikultur secara individual agar sekretomnya dapat dianalisis. Jika proteomik atau metabolomik diadopsi di tingkat dasar, apakah mungkin untuk membiakkan dua juta embrio satu per satu menggunakan sistem WOW? Selain itu, bahkan jika prestasi besar ini dapat dicapai, serangkaian tantangan yang sama seperti transkriptomik harus diatasi.

Oleh karena itu, jelas bahwa meskipun alat-alat ini sangat kuat dan berguna untuk memahami perkembangan/fisiologi embrio pra-implantasi, hampir tidak mungkin alat-alat ini dapat diterapkan langsung di lapangan dalam evaluasi embrio hidup.

4.3. Alat Evaluasi Embrio yang Ideal

Salah satu karakteristik utama alat evaluasi embrio yang ideal adalah dapat diadopsi oleh ribuan fasilitas penghasil/pengumpul embrio. Alat tersebut harus memenuhi sebagian besar, jika tidak seluruh, dari tujuh kriteria berikut:

1. Metode tersebut harus memberikan hasil yang akurat;
2. Tindakan tersebut harus bersifat non-invasif;
3. Harus objektif (meminimalkan subjektivitas manusia);
4. Tanpa bias/bias rendah (bayangkan contoh model kuda);

5. Secara teknis harus cukup sederhana untuk dilaksanakan di fasilitas produksi embrio itu sendiri;
6. Evaluasi harus diselesaikan dengan blastulasi sehingga blastokista berkualitas tinggi dapat segera diidentifikasi untuk transfer langsung, tanpa jeda seperti pada teknik berbasis omics;
7. Hasilnya harus tersedia dalam beberapa jam setelah pengumpulan sampel sehingga siklus pembekuan-pencairan kedua dapat dihindari.

Berdasarkan Tabel11, yang membandingkan alat umum evaluasi embrio berdasarkan kriteria di atas, tidak ada satu pun alat yang memenuhi semua kriteria. Namun, mikroskop berbasis TLM dan AI memenuhi kriteria yang paling disukai (kotak hijau).

Tabel 11. Perbandingan berbagai alat yang tersedia untuk evaluasi embrio (hijau menunjukkan ciri yang menguntungkan, sedangkan oranye menunjukkan ciri yang kurang baik).

	Ketepatan	Alam Invasif	Subyektivitas	Biaya Awal dan/atau Biaya Operasi	Kompleksitas Teknis	Evaluasi Selesai dengan Blastulasi	Perlu Langkah Pembekuan Ekstra
Stereoskopi	Rendah	Rendah	Tinggi	Rendah	Rendah	TIDAK	TIDAK
Fluoresensi mikroskopi	Tinggi	Tinggi	Rendah	Tinggi	Tinggi	T/A**	T/A**
Elektron mikroskopi	Tinggi	Tinggi	Rendah	Tinggi	Tinggi	T/A**	T/A**
GLIM	Tinggi	Rendah	Rendah	Tinggi	Tinggi	TIDAK	TIDAK
TLM	Tinggi	Rendah	Rendah	Tinggi	Rendah	Ya	TIDAK
berbasis AI mikroskopi	Tinggi	Rendah	Rendah	Rendah	Tinggi	TIDAK	TIDAK
Genomik	Tinggi	Tinggi *	Rendah	Tinggi	Tinggi	TIDAK	Ya
Transkriptomik	Tinggi	Tinggi *	Rendah	Tinggi	Tinggi	TIDAK	Ya
Proteomik	Tinggi	Rendah	Rendah	Tinggi	Tinggi	TIDAK	Ya
Metabolomik	Tinggi	Rendah	Rendah	Tinggi	Tinggi	TIDAK	Ya
NMR	Tinggi	Rendah	Rendah	Tinggi	Tinggi	TIDAK	Ya

* Jika biopsi blastomer diuji dan bukan seluruh embrio, embrio masih dapat hidup dan dapat digunakan untuk pasca pengujian ET, namun tetap dianggap invasif. ** Embrio kehilangan viabilitasnya sebelum/selama evaluasi, dan oleh karena itu, kriteria ini tidak dapat diterapkan.

TLM memenuhi kriteria yang tidak dimiliki oleh yang lain: yaitu, TLM dapat menyelesaikan evaluasi embrio pada saat blastulasi berlangsung berdasarkan analisis morfokinetik dari beberapa pembelahan pertama. Studi TLM telah digunakan untuk menunjukkan bahwa MKI seperti waktu pembelahan pertama, jumlah blastomer pada pembelahan pertama, dan jumlah blastomer pada permulaan fase lag mempunyai korelasi yang kuat dengan angka kehamilan pasca transfer.94,95]. Pengamatan pra-blastulasi ini bahkan membuat beberapa orang berpendapat bahwa MKI dapat menggantikan sistem penilaian berbasis morfologi IETS [81]. Namun, kendala utama dalam penggunaan MKI adalah kebutuhan untuk melacak embrio individu selama kultur menggunakan sistem WOW dan peralatan pencitraan TLM yang canggih dan mahal. Oleh karena itu, kami menekankan perlunya penelitian di masa depan untuk fokus pada perancangan alternatif pencitraan yang terjangkau dan dapat dimasukkan ke dalam inkubator yang ada. Kamera mandiri atau ponsel pintar yang dapat ditempatkan di dalam inkubator dan mampu berkomunikasi dengan komputer melalui WiFi mungkin cukup untuk tujuan ini. Misalnya, de Souza Ciniciato, Takahashi, 2017 [255] dan Guilherme, Ucapkan, 2018 [252], menggunakan ponsel pintar untuk menangkap gambar digital blastokista dengan keberhasilan yang terbatas. Mengingat bahwa metode evaluasi embrio yang berhasil perlu diadopsi oleh masyarakat luas dan

bahwa setiap orang memiliki akses terhadap telepon pintar saat ini, kami percaya bahwa penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk memahami bagaimana pengambilan gambar menggunakan telepon pintar dapat digunakan dalam evaluasi embrio, khususnya di TLM. Lensa makro yang kompatibel dengan ponsel cerdas mengklaim hingga 400×aplikasi fotografi berbasis pembesaran dan pengatur waktu tersedia di pasaran yang mungkin cukup untuk jenis aplikasi yang relatif sederhana ini. Aplikasi biomedis berbasis ponsel pintar saat ini banyak digunakan dalam berbagai aplikasi diagnostik, histopatologi, dan mikrobiologi [264–266].

Mikroskop otomatis berbasis AI telah digunakan untuk memproses dan menganalisis gambar secara obyektif dan otomatis. Dengan menggunakan jaringan saraf tiruan (JST), algoritma genetika (GA), dan pemrosesan gambar otomatis, kualitas embrio diklasifikasikan dengan tingkat keberhasilan yang tinggi [1,253]. Kami percaya bahwa teknologi ini memiliki potensi yang tinggi*di lapangan* evaluasi embrio mempertimbangkan manfaatnya yang diuraikan dalam Tabel11. Telah diketahui bahwa variabilitas halus dalam warna, kecerahan, bentuk, dan fitur luput dari perhatian manusia.267] hanya karena keterbatasan kapasitas fisiologis mata manusia dan variabilitas akurasi, pengalaman, dan suasana hati ahli embriologi [7]. Pemrosesan gambar otomatis dengan analisis gambar objektif, dibantu oleh pembelajaran mesin, dapat mengatasi keterbatasan mata manusia.

Sistem TLM komersial tertentu sudah menggunakan pemrosesan gambar otomatis sampai tingkat tertentu. Kami percaya bahwa jika evaluasi berbasis AI dapat dikombinasikan dengan TLM dengan cara yang terjangkau oleh banyak orang, hal ini mempunyai potensi untuk digunakan untuk*di lapangan*evaluasi embrio.

4.4. Penerapan Alat Berbasis Omics pada Kondisi Lapangan

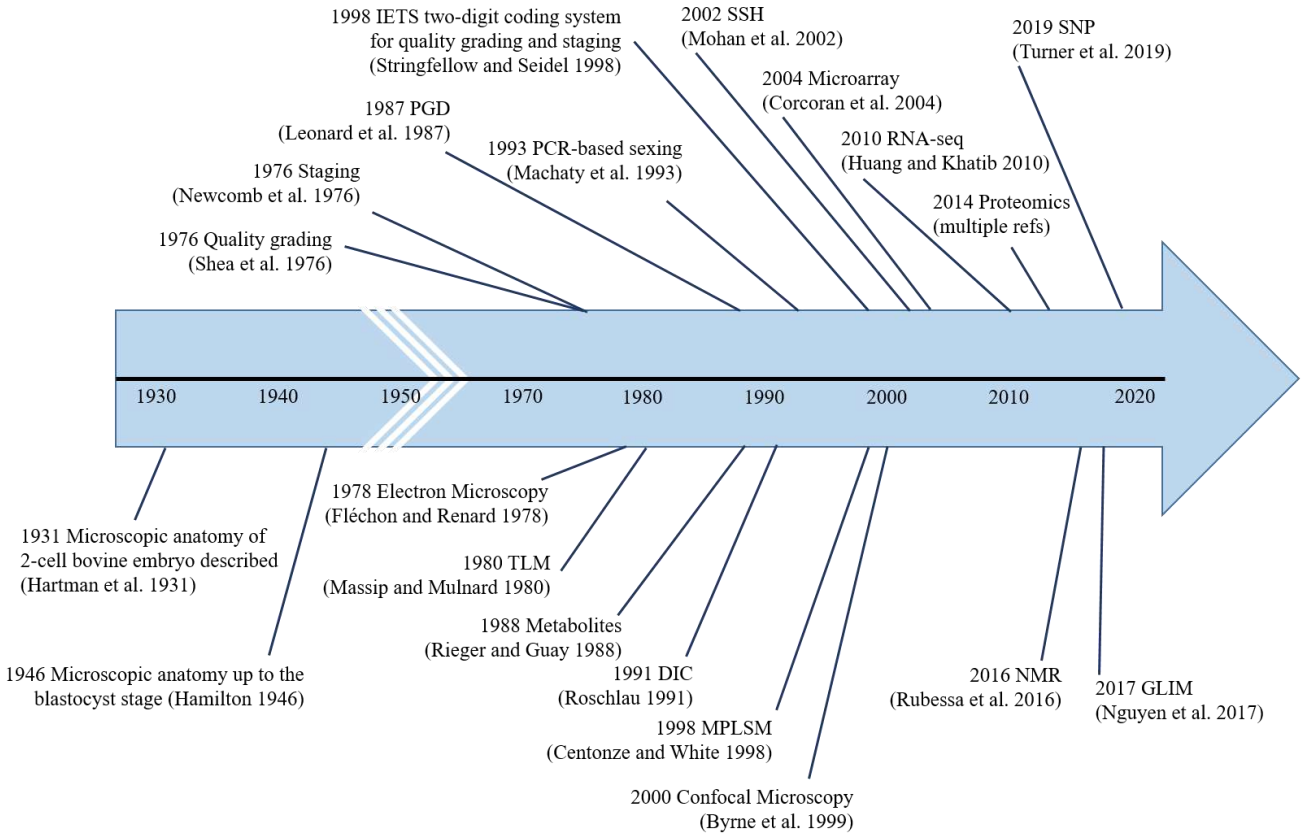
Berbeda dengan mikroskop berbasis AI dan TLM, teknologi berbasis omics memiliki keterbatasan besar yang melarang penerapan arah alat-alat ini dalam kondisi lapangan, misalnya, kebutuhan akan keahlian teknis untuk pengoperasian dan kebutuhan akan siklus pembekuan-pencairan tambahan. Namun, hal ini tidak berarti bahwa metode berbasis omics, GLIM, atau NMR tidak dapat digunakan untuk evaluasi embrio di lapangan. Meski tidak bisa digunakan secara langsung*di lapangan*, mereka dapat digunakan secara tidak langsung untuk mempersempit biomarker viabilitas embrio, yang dapat dideteksi *di lapangan*menggunakan metodologi yang lebih sederhana. Misalnya, menggunakan skrining proteomik media kultur berbasis spektrometri massa, Raes, Wydooghe, 2023 [210], menemukan bahwa media yang dikondisikan oleh embrio sapi berkualitas baik dan baik, tetapi bukan embrio berkualitas buruk, mengandung cathepsin-L. Jika cathepsin-L akan diadopsi sebagai biomarker viabilitas/kualitas embrio sapi untuk evaluasi embrio, spektrometri massa tidak perlu dilakukan di permukaan tanah. Sebaliknya, metodologi deteksi protein sederhana seperti ELISA, yang non-invasif, sederhana, terjangkau, dan dapat diadopsi oleh banyak orang, dapat dikembangkan untuk deteksi cathepsin-L di lapangan. Sebagai alternatif, media kultur dapat dikembangkan yang berubah warna dengan adanya cathepsin-L konsentrasi tinggi.

Mayoritas penelitian yang dilakukan hingga saat ini membatasi tujuannya untuk menemukan hubungan antara tanda biomarker dan kualitas blastokista. Hanya sedikit penelitian yang menghubungkan tanda-tanda biomarker dengan hasil kehamilan. Kami sangat menyarankan agar penelitian di masa depan menekankan penyelidikan korelasi antara tanda biomarker embrio pra-implantasi dan hasil kehamilan. Hal ini berlaku tidak hanya pada biomarker berbasis omics tetapi juga pada alat lain, termasuk teknik mikroskopis.

5. Kesimpulan

Evaluasi embrio sapi pra-implantasi telah berkembang pesat, mulai dari analisis mikroskopis sederhana pada tahun 1931 hingga analisis berbasis PCR pada tahun 1990an hingga analisis berbasis omics pada abad ke-21 (Gambar4). Alat evaluasi embrio yang ideal tidak hanya harus akurat, obyektif, non-invasif, dan terjangkau namun juga cukup sederhana untuk diadopsi oleh ribuan fasilitas produksi/pengumpulan embrio di seluruh dunia. Oleh karena itu, dalam kondisi saat ini, sangat tidak mungkin transkriptomik, proteomik, metabolomik, GLIM, NMR, dll., dapat langsung digunakan untuk*di lapangan*evaluasi embrio. Namun, biomarker yang diidentifikasi oleh metodologi ini dapat digunakan*di lapangan*evaluasi embrio dengan merancang sederhana, terjangkau*bangku cadangan*teknik. Penelitian lebih lanjut tentang otomatisasi berbasis TLM dan AI

pemrosesan gambar dijamin menjadikannya lebih terjangkau (khususnya TLM), karena kami melihat potensi besar metodologi ini untuk diadopsi oleh masyarakat luas, asalkan dapat dibuat terjangkau.



Gambar 4. Tonggak penting dalam analisis embrio sapi pra-implantasi. Contoh pertama penggunaan masing-masing metodologi ditunjukkan, yaitu anatomi mikroskopis [13,14], penilaian kualitas [16], memanggungkan [21], mikroskop elektron [41], mikroskop selang waktu [92], pengujian genetik [113], pengujian metabolit [212], mikroskop kontras interferensi diferensial [30], sexing berbasis PCR [116], sistem pengkodean dua digit IETS [20], mikroskop pemindaian laser multi-foton [85], mikroskop konfokal [71], penindasan hibridisasi subtraktif [140], array mikro [142], urutan RNA [178], proteomik, resonansi magnetik nuklir [231], mikroskop interferensi cahaya gradien [58], dan polimorfisme nukleotida tunggal [139].

Bahan Tambahan: Informasi pendukung berikut dapat diunduh dihttps://www.mdpi.com/article/10.3390/ani13132102/s1: Gambar S1–S19. Gambar S1. 100×DIC. Embrio tahap 5 Kelas 1. Blastokista awal dikumpulkan pada hari ke 7 setelah permulaan estrus. Perhatikan keberadaan blastomer tepat di dalam VM yang menyebabkan tonjolan tidak beraturan, atau tepi bergelombang pada VM. Massa sel bagian dalam ditambah blastocoele dan VM secara kolektif disebut embrio sebenarnya. Bandingkan tonjolan pada VM blastokista awal ini dengan VM yang sangat halus dan tidak menggembung pada sel telur yang tidak dibuahi (UFO). *[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Gambar S2. 100×DIC. Embrio yang sama seperti slide #4 dan #5, tetapi panah menunjuk ke masing-masing blastomer. Juga, satu blastomer yang menyatu diberi garis kuning*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023]*. Gambar S3. 400×DIC. Tahap 4, Kelas 1. Ini adalah morula hari ke 7 yang secara anatomi hampir sempurna. Hanya ada sedikit, jika ada, blastomer yang diekstrusi di luar VM. Faktor pembeda antara ini dan UFO adalah penonjolan blastomer pada embrio ini yang menyebabkan VM menjadi tidak beraturan, namun berdekatan dan terlihat. Pemeriksaan yang cermat terhadap embrio memungkinkan seseorang melihat sejumlah besar blastomer yang menyatu.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S4. 400×sahabat. Tahap 4, Tingkat 2. Bisa dibilang, embrio ini dapat dianggap sebagai tingkat 1 dan bukan tingkat 2. Massa utama (yang dilingkari - lihat slide berikutnya) memiliki VM yang sangat jelas yang mencakup kelompok blastomer sehat yang menyatu dengan baik. Pada bidang tampak terdapat dua blastomer besar yang diekstrusi. Saat embrio digulung, terlihat dua embrio lagi yang lebih kecil di sisi belakangnya.

Ini adalah contoh bagus tentang subjektivitas yang terlibat dalam penilaian embrio.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S5. 100×DIC. Tahap 4, Tingkat 3. Morula ini memiliki beberapa sel yang tidak menyatu (panah) yang diekstrusi pada bidang ini, ditambah beberapa sel lainnya seperti yang diamati saat menggelinding. Massa sehat yang menyatu di tengah mewakili sekitar setengah dari total blastomer.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Gambar S6. 200×sahabat. Tahap 5 Kelas 1. Panah menunjuk ke rongga blastocoele yang berkembang awal "berongga".*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S7. 400×DIC. Tahap 5, Tingkat 3. Sel-sel yang hidup dalam embrio ini telah berdiferensiasi dan membentuk blastocoele (bagian kiri bawah dari massa sel yang dikelilingi – lihat slide berikutnya – rongga berongga). Sel-sel yang tersisa tidak menyatu dan mati.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S8. 200×DIC. Tahap 6, Kelas 1. Panah kuning menunjuk ke rongga blastocoele. Blastokoel yang berwarna lebih terang memiliki volume total sedikit lebih banyak daripada massa sel bagian dalam. Itulah standar untuk mengklasifikasikan embrio sebagai blastokista tahap akhir (tahap 6). Panah biru menunjuk ke trofoblas. Panah merah menunjuk ke massa sel bagian dalam.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S9. 100×DIC. Tahap 6, Tingkat 1. Ukuran blastocoele kira-kira dua kali massa sel bagian dalam. Embrio yang tepat telah berkembang hingga VM sekarang menghubungi zona tersebut, sehingga menghilangkan ruang perivitelline yang terlihat. Namun zona tersebut belum mulai berkembang secara geometris dan tipis, sehingga embrio ini diklasifikasikan sebagai Tahap 6, bukan Tahap 7 (blastokista yang diperluas). Satu hal penting yang harus diperhatikan tentang embrio yang tidak memiliki ruang perivitelline – banyak dari embrio ini akan diklasifikasikan sebagai Kelas 1 karena setiap blastomer yang diekstrusi diratakan antara VM dan zona, dan oleh karena itu seringkali sulit untuk divisualisasikan.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S10. 100×DIC. Tahap 6, Tingkat 2. Meskipun embrio sebenarnya tidak memiliki ketidaksempurnaan, zona tersebut retak parah dan robek pada jam 9 sehingga mengakibatkan penurunan Nilai dari 1 menjadi 2. Embrio ini tidak memenuhi syarat untuk diekspor.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S11. 100×DIC. Tahap 6 (bisa dibilang tahap 5), Kelas 3. Ketika embrio ini digulung selama evaluasi, lebih mudah untuk melihat bahwa blastocoele (lingkaran – lihat slide berikutnya) sedikit lebih besar daripada massa sel bagian dalam. Selain itu, sekitar setengah dari total massa sel telah mati sehingga membuat embrio menjadi Kelas 3.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S12. 100×DIC. Tahap 7, Tingkat 1. Blastokoel mewakili sekitar 70% dari embrio, dan massa sel bagian dalam (panah kuning) relatif lebih kecil (sekitar 30% dari embrio). Embrio sebenarnya telah berkembang sampai ke zona tersebut, dan zona tersebut meregang/menipis untuk mengakomodasi pertumbuhan. Lapisan tipis trofoblas memanjang dari sudut massa sel bagian dalam dan meluas sepanjang seluruh batas luar blastokel dan mendekati batas dalam zona.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S13. 400×sahabat. Penetasan blastokista, Tahap 8, Kelas 1. Zona telah retak (jam 6 hingga 8) di bawah tekanan pertumbuhan blastokista.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S14. 400×sahabat. Tahap 8, Kelas 1. Ini adalah blastokista yang menetas dalam kondisi hampir sempurna. Biasanya, rasio blastocoele terhadap massa sel bagian dalam akan lebih besar dibandingkan pada embrio ini.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S15. 100×DIC. #1 adalah zona kosong. Lihat air mata pada jam 9. Perhatikan bagaimana dinding zona lebih tipis di #1 dibandingkan dengan #2 dan #3 (keduanya tahap 7, kelas 1). #4 adalah blastokista yang menetas (Tahap 8, Kelas 1) tanpa zona. #1 kemungkinan besar adalah zona miliknya

4.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Gambar S16. 100×DIC. Tiga embrio dengan panah kuning adalah Tahap 7, Kelas 2. Perhatikan tampilan granular berwarna coklat pada rongga blastocoele embrio tersebut dibandingkan dengan blastokista yang diperluas dengan tembus cahaya (panah hijau) pada foto mikro ini. Granulasi merupakan artefak dari puing-puing seluler bersama dengan sel-sel mati dan mengalami degenerasi yang terperangkap erat antara trofoblas dan zona. Panah hijau menunjuk ke embrio Tingkat 1.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S17. 100×DIC. #1 = Tahap 7, Kelas 1 (7-1). #2 = 6-1, #3 = 5-1, #4 = 6-1. #5 = 6-1, #6 = 6-1,. #7 = 7-1 (perhatikan diameter dibandingkan dengan embrio yang berbatasan), #8 = 5-1.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Gambar S18. 40×sahabat. Panah merah menunjuk ke embrio Tahap 7, Kelas 1. Panah hijau menunjuk ke embrio Tahap 6, Tingkat 1. Panah kuning mewakili embrio Tahap 5, Kelas 1. Panah biru menunjuk ke Tahap 4, Kelas 1. Panah putus-putus berwarna oranye menunjuk ke UFO yang terfragmentasi. Embrio apa pun dengan zona retak akan diturunkan peringkatnya dari Tingkat 1 ke Tingkat 2.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*Gambar S19. 40×sahabat. #1 = Tahap 7, Kelas 1. #2 dan

3 = Tahap 7, Kelas 1. #4 - Tahap 6, Kelas 1. Blastokoel tampak lebih kecil dari massa sel dalam (ICM) dalam pandangan ini, namun ketika digulung, blastokoele lebih besar dari ICM. #5 = Tahap 7, Kelas 1. Perhatikan diameternya yang besar, ditambah penipisan zona akibat perluasan fisik pertumbuhan. #6 = Tahap 7, Kelas 1 (bisa dibilang tahap 6). #7 = Tahap 6, Kelas 1 (bisa dibilang tahap 5). #8 = Tahap 7, Kelas 1. #9 dan #10 = Tahap 5, Kelas 1. #11 dan #12 = Tahap 7, Kelas 1. #13 = Tahap 5, Kelas 1 (bisa dibilang tahap 6). #14 = Tahap 4, Kelas 2 (bisa dibilang kelas 1). 15 = Tahap 5, Tingkat 1. #16 = Tahap 7, Tingkat 1. #17 = Tahap 4, Tingkat 3. VM dalam embrio ini sangat tidak jelas. VM memiliki tampilan "berjumbai" sekitar pukul 12 hingga 6. Kemungkinan besar terdapat beberapa sel yang dapat hidup dan menyatu dalam massa utama, namun banyak sel perifer yang mengalami degenerasi. #18 = Tahap 4, Tingkat 2. Blastomernya mati pada pukul 6, 7, dan 12. #19 = Tahap 5, Kelas 1 (bisa dibilang tahap 6). #20 = Tahap 6, Kelas 1. #21 = Tahap 7, Kelas 1 (bisa dibilang tahap 6). #22 = Tahap 5, Tingkat 1. #23, 24, dan 25 = Tahap 4, Tingkat 1. #26 = Tahap 4, Tingkat 2. Bentuk embrio sebenarnya adalah non-bola secara geometris. #27 = Tahap 4, Kelas 2 (bisa dibilang tahap 5) karena zona retak pada jam 3. #28 = Tahap 7, Tingkat 1. #29 = Tahap 6, Tingkat 1. Embrio ini berbentuk agak lonjong, namun tidak memiliki cacat lainnya. #30 = Tahap 7, Kelas 1. #31 = Tahap 6, Kelas 1. #32 = Tahap 7, Kelas 1. #33 = Tahap 6, Kelas 1. #34 = Tahap 4, Kelas 1. #35 = Tahap 7, Kelas 1. #36 = Tahap 7, Kelas 1 (bisa dibilang tahap 6). #37 = Tahap 4, Kelas 2 (zona retak). Embrio ini mungkin merupakan Tahap 7 dengan rongga blastocoele yang runtuh karena kekuatan fisik selama prosedur pengumpulan embrio. Diameter zona ini terasa lebih besar dibandingkan dengan embrio 34. Retakan pada zona tersebut sekitar pukul 7. #38 = Tahap 7, Kelas 1. #39 = Tahap 5, Kelas 1. #40 = Tahap 6, Kelas 1.*[Gambar dan keterangan diberikan dengan izin dari International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*

Kontribusi Penulis: Penulisan—persiapan draf asli, RACR, PVM, EAB, KW, DJM dan MBW; penulisan—review dan pengeditan, RACR, MBW, PVM dan DJM; pengawasan, MBW; administrasi proyek, MBW; perolehan pendanaan, MBW Semua penulis telah membaca dan menyetujui versi naskah yang diterbitkan.

Pendanaan: Pekerjaan ini sebagian didukung oleh USDA Multistate Project W-4171 #ILLU-538-947 dan Ross Foundation #635148.

Pernyataan Dewan Peninjau Kelembagaan: Tak dapat diterapkan.

Pernyataan Persetujuan yang Diinformasikan: Tak dapat diterapkan.

Pernyataan Ketersediaan Data: Karena ini adalah artikel ulasan, semua data yang digunakan dalam penyusunan naskah ini tersedia secara bebas untuk umum.

Ucapan Terima Kasih: Naskah ini didedikasikan untuk George E. Seidel, Jr. Visinya memulai sebuah industri, dan ide-idenya membantu industri ET tumbuh dan sejahtera. Semangat Seidel dalam mengejar ilmu pengetahuan dan murid-muridnya telah meninggalkan warisan abadi bagi umat manusia.

Konflik kepentingan: Para penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

Referensi

1. Rocha, JC; Passalia, FJ; Matos, FD; Takahashi, MB; Maserati, MP, Jr.; Alves, MF; de Almeida, TG; Cardoso, BL; Basso, AC; Nogueira, MFG Pemrosesan gambar otomatis blastokista sapi yang diproduksi secara in vitro untuk penentuan variabel kuantitatif. *Sains. Data***2017**,*4*, 170192.[Referensi Silang]
2. Viana, J. 2021 Statistik produksi dan transfer embrio pada hewan ternak dalam negeri.*Teknologi Embrio. Berital.***2022**,*40*, 19.
3. Marsico, T.; De Camargo, J.; Valente, RS; Sudano, MJ Kompetensi embrio dan cryosurvival: Fitur molekuler dan seluler. *animasi. mereproduksi.***2019**,*16*, 423–439. [Referensi Silang]
4. Ealy, IKLAN; Wooldridge, LK; McCoski, Tinjauan yang Diundang Dewan SR: Konsekuensi pasca-transfer dari embrio yang diproduksi secara in vitro pada sapi. *J.Anim. Sains.***2019**,*97*, 2555–2568. [Referensi Silang]
5. Farin, P.; Britt, J.; Shaw, D.; Slenning, B. Kesepakatan antar evaluator embrio sapi yang diproduksi in vivo atau in vitro.*Teriogenologi***1995**, *44*, 339–349. [Referensi Silang] [PubMed]
6. Hansen, PJ Janji transfer embrio pada sapi yang belum sepenuhnya terpenuhi—Mengapa angka kebuntingan tidak lebih besar dan apa yang dapat kita lakukan untuk mengatasinya?*J.Anim. Sains.***2020**,*98*, skaa288. [Referensi Silang] [PubMed]
7. Lindner, GM; Wright, RW Morfologi dan evaluasi embrio sapi.*Teriogenologi***1983**,*20*, 407–416. [Referensi Silang]
8. Schneider, H.; Castleberry, R.; Griffin, J. Aspek komersial transfer embrio sapi.*Teriogenologi***1980**,*13*, 73–85. [Referensi Silang] [PubMed]
9. Tervit, H.; Cooper, M.; Bagus, PG; Haszard, G. Transfer embrio non-bedah pada sapi.*Teriogenologi***1980**,*13*, 63–71. [Referensi Silang]
10. Donnay, I. Penanda Metabolik Viabilitas Embrio. Di dalam*Penilaian Kualitas Embrio Mamalia: Teknik Invasif dan Non-Invasif*; Van Soom, A., Boerjan, M., Eds.; Springer: Dordrecht, Belanda, 2002; hal 57–94.

11.BHai,G.; Mapletoft, R. Evaluasi dan klasifikasi embrio sapi.*animasi. mereproduksi. (AR)***2018**,*10*, 344–348.
12. Gomez, E.; Canela, N.; Herrero, P.; Cereto, A.; Gimeno, saya.; Carrocera, S.; Martin-Gonzalez, D.; Murillo, A.; Muñoz, M. Metabolit yang Disekresikan oleh Embrio Sapi In Vitro Memprediksi Kehamilan Yang Tidak Dapat Dilakukan Metabolom Plasma Penerima, dan Begitu pula sebaliknya. *Metabolisme***2021**,*11*, 162.[Referensi Silang]
13. Hartman, CG; Lewis, WH; Miller, FW; Swett, WW Temuan pertama sel telur tuba pada sapi, beserta catatan tentang estrus.*Anat. Rek.***1931**,*48*, 267–275. [Referensi Silang]
14. Hamilton, WJ; Laing, JA Perkembangan sel telur sapi sampai tahap pembentukan blastokista.*J.Anat.***1946**,*80*, 194.[PubMed]

15. Seidel, GE Tinjauan Kritis terhadap Prosedur Transfer Embrio dengan Sapi. Di dalam*Fertilisasi dan Perkembangan Embrionik In Vitro*; Mastroianni, L., Lebih Besar, JD, Eds.; Springer: Boston, MA, AS, 1981; hal.323–353.
16. Shea, B.; Hines, D.; Kaki Ringan, D.; Ollis, G.; Olson, S. Pemindahan embrio sapi. Di dalam*Seminar Penelitian Pertanian*; Komisi Komunitas Eropa: Brussels, Belgia, 1976; hal.145–152.
17. Elsden, R.; Nelson, L.; Seidel, G. Superovulasi sapi dengan hormon perangsang folikel dan serum gonadotropin kuda hamil. *Teriogenologi***1978**,*9*, 17–26. [Referensi Silang]
18. Shea, B. Mengevaluasi embrio sapi.*Teriogenologi***1981**,*15*, 31–42. [Referensi Silang] [PubMed]
19. Sarang Baru, R.; Rowson, LEA Tingkat konsepsi setelah transfer uterus telur sapi, dalam kaitannya dengan sinkronisasi estrus dan umur telur.*Reproduksi***1975**,*43*, 539–541. [Referensi Silang] [PubMed]
20. Rekan senar, DA; Seidel, SM*Manual Masyarakat Transfer Embrio Internasional*; Masyarakat: Burlington, ON, Kanada, 1998.
21. Sarang Baru, R.; Rowson, L.; Trounson, A. Masuknya sel telur superovulasi ke dalam rahim. Di dalam*Transfer Telur pada Sapi*; Komisi Komunitas Eropa: Brussels, Belgia, 1976; hlm.1–15.
22. Rocha, JC; Passalia, FJ; Matos, FD; Maserati, MP, Jr.; Alves, MF; De Almeida, TG; Cardoso, BL; Basso, AC; Nogueira, Metode MFG untuk menilai kualitas embrio mamalia: Seberapa jauh kita dari standar emas?*Bantuan JBRA. mereproduksi.* **2016**,*20*, 150–158. [Referensi Silang]
23. Donnay, saya.; Partridge, RJ; Leese, HJ Apakah metabolisme embrio dapat digunakan untuk menyeleksi embrio sapi sebelum dipindahkan?*mereproduksi. Nutrisi. Dev.* **1999**,*39*, 523–533. [Referensi Silang]
24.de Myaituxico, A. Penilaian embrio Bos taurus membandingkan mikroskop stereoskopis dan mikroskop elektron transmisi. *J. Sel Anim. biologi.***2008**,*2*, 072–078.
25. Sopir, AM; Peñagaricano, F.; Huang, W.; Ahmad, KR; Hackbart, KS; Wiltbank, MC; Analisis Khatib, H. RNA-Seq mengungkap variasi transkriptomik antara blastokista sapi yang diturunkan secara morfologis yang serupa secara in vivo dan in vitro.*Genom BMC.***2012**, *13*, 118.[Referensi Silang]

26. Antonius, PPMA; Trefois, C.; Stojanovic, A.; Baumuratov, AS; Kozak, K. Aplikasi mikroskop cahaya dalam biologi sistem: Peluang dan tantangan.*Komunikasi Sel. Sinyal.***2013**,*11*, 24.[Referensi Silang] [PubMed]
27. Aguilar, MM; Galina, CS; Pedagang, H.; Montiel, F.; Canseco, R.; MArquez, YC Perbandingan stereoskopi, mikroskop cahaya dan metode ultrastruktural untuk evaluasi embrio sapi.*mereproduksi. Domestik. animasi.***2002**,*37*, 341–346. [Referensi Silang] [PubMed]
28. Nishiwaki, S.; Narumi, K.; Korenaga, T. Teknologi pencitraan kontras fase interferensi tanpa pemisahan berkas.*Sains. Reputasi.***2019**, *9*, 1753.[Referensi Silang]
29. Rubessa, M.; Wheeler, MB Mikroskop bebas label: Alat baru non-invasif untuk menilai kualitas gamet dan embrio.*Teriogenologi* **2020**,*150*, 241–246. [Referensi Silang]
30. Roschlau, K. Studi transfer gen pada sapi.*J.Reproduksi. Subur.***1991**,*43*, 293–295. [Referensi Silang]
31. Bavister, BD; Rose-Hellekant, TA; Pinyopummintr, T. Pengembangan embrio sapi yang matang secara in vitro/dibuahi in vitro menjadi morula dan blastokista dalam media kultur tertentu.*Teriogenologi***1992**,*37*, 127–146. [Referensi Silang]
32. Elmileik, A.; Maeda, T.; Terada, T. Tingkat perkembangan blastokista yang lebih tinggi setelah fertilisasi in vitro oosit sapi yang matang dalam media yang dilengkapi dengan cairan dari folikel sapi besar.*animasi. mereproduksi. Sains.***1995**,*38*, 85–96. [Referensi Silang]
33. Tominaga, K.; Shimizu, M.; Ooyama, S.; Izaike, Y. Pengaruh polarisasi lipid dengan sentrifugasi pada berbagai tahap perkembangan terhadap kelangsungan hidup sapi pasca pencairan in vitro yang menghasilkan embrio 16 sel.*Teriogenologi***2000**,*53*, 1669–1680. [Referensi Silang] [PubMed]
34. Abe, H.; Yamashita, S.; Satoh, T.; Hoshi, H. Akumulasi tetesan lipid sitoplasma pada embrio sapi dan kriotoleransi embrio yang dikembangkan dalam sistem kultur berbeda menggunakan media bebas serum atau yang mengandung serum.*mol. mereproduksi. Dev.***2001**,*61*, 57–66. [Referensi Silang]

35. Duszewska, A.; Kozikova, L.; Szydlik, H.; Cybulska, M.; Korwin-Kossakowski, M.; Połoszynowicz, J.; Wicińska, K.; Rosochaki, S.; Waś, B. Penggunaan protein fluoresen hijau (GFP) untuk memilih embrio sapi.*J.Anim. Memberi makan. Sains.***2003**,*12*, 71–81. [Referensi Silang]
36. Rosochacki, SJ; Kozikova, LV; Korwin-Kossakowski, M.; Matejczyk, M.; Połoszynowicz, J.; Duszewska, A. Skrining fluoresen noninvasif pada embrio sapi yang disuntikkan mikro untuk memprediksi integrasi transgen.*Folia Biol.***2003**,*51*, 97–104.
37. Neuber, E.; Luetjens, C.; Chan, A.; Schatten, G. Analisis fragmentasi DNA blastokista sapi yang dibudidayakan secara in vitro menggunakan TUNEL.*Teriogenologi***2002**,*57*, 2193–2202. [Referensi Silang]
38. Pereira, R.; Baptista, M.; Vasques, M.; Horta, A.; Portugal, P.; Bessa, R.; e Silva, JC; Pereira, MS; Marques, C. Cryosurvival blastokista sapi ditingkatkan dengan kultur dengan asam linoleat terkonjugasi trans-10 cis-12 (10t,12c CLA).*animasi. mereproduksi. Sains.***2007**,*98*, 293–301. [Referensi Silang] [PubMed]

39. Pereira, R.; Carvalhais, I.; Pimenta, J.; Baptista, M.; Vasques, M.; Horta, A.; Santos, saya.; Marques, MDR; Reis, A.; Pereira, MS; dkk. Viabilitas embrio sapi yang dibiopsi dan divitrifikasi ditingkatkan dengan suplementasi asam linoleat terkonjugasi trans10 dan cis12 selama kultur embrio in vitro.*animasi. mereproduksi. Sains.***2007**,*106*, 322–332. [Referensi Silang]
40. Malatesta, M. Mikroskop Elektron Transmisi sebagai Alat Ampuh untuk Menyelidiki Interaksi Nanopartikel dengan Struktur Subseluler. *Int. J.Mol. Sains.***2021**,*22*, 12789.[Referensi Silang]
41. Flechon, J.-E.; Renard, J.-P. Sebuah studi pemindaian mikroskop elektron tentang penetasan blastokista sapi secara in vitro.*Reproduksi***1978**, *53*, 9–12. [Referensi Silang] [PubMed]
42. Massip, A. Ultrastruktur blastokista sapi.*J. Submikrosa. sitol.***1981**,*13*, 31–40.
43. Krosier, AE; Farin, PW; Dykstra, MJ; Alexander, JE; Farin, CE Morfometri Ultrastruktural Blastokista Sapi Diproduksi Secara In Vivo atau In Vitro. *biologi. mereproduksi.***2001**,*64*, 1375–1385. [Referensi Silang] [PubMed]
44. Laurincik, J.; Thomsen, P.; Hay-Schmidt, A.; Avery, B.; Greve, T.; Aduh, R.; Hyttel, P. Protein Nukleolar dan Ultrastruktur Nuklir dalam Embrio Sapi Praimplantasi yang Diproduksi Secara In Vitro.*biologi. mereproduksi.***2000**,*62*, 1024–1032. [Referensi Silang]
45. Raja, WA; Niar, A.; Chartrain, saya.; Betteridge, KJ; Guay, P. Daerah pengatur nukleolus dan nukleolus pada embrio sapi sebelum melekat.*Reproduksi***1988**,*82*, 87–95. [Referensi Silang]
46. Kopečndan,V.; lantaiyaituchon, JE; Kamuflase, S.; Fulka, J. Nukleologenesis dan permulaan transkripsi pada embrio sapi delapan sel: Studi autoradiografi struktur halus.*mol. mereproduksi. Dev.***1989**,*1*, 79–90. [Referensi Silang] [PubMed]
47. Baran, V.; lantaiyaituchon, J.-E.; Pivko, J. Nukleologenesis pada embrio sapi yang membelah: Aspek imunositokimia.*mol. mereproduksi. Dev.* **1996**,*44*, 63–70. [Referensi Silang]
48. Laurincik, J.; Kopecny, V.; Hyttel, P. Analisis rinci perkembangan pronukleus pada zigot sapi in vivo: Ultrastruktur dan kronologi siklus sel. *mol. mereproduksi. Dev. Inc. Gamet Res.***1996**,*43*, 62–69. [Referensi Silang]
49. Laurincik, J.; Hyttel, P.; Baran, V.; Lucas-Hahn, A.; Eckert, J.; Pivko, J.; Niemann, H.; Brem, G.; Schellander, K. Perkembangan pronukleus dan organisasi badan intranuklear selama kemajuan siklus sel embrio sapi pertama in vitro.*mol. mereproduksi. Dev.***1998**,*50*, 192–199.
50. Crozet, N. Aspek ultrastruktural fertilisasi in vivo pada sapi.*Res Gamet.***1984**,*10*, 241–251. [Referensi Silang]
51. Kuwayama, M.; Fujikawa, S.; Nagai, T. Ultrastruktur Blastokista Sapi IVM-IVF yang Divitrifikasi setelah Kesetimbangan dalam Gliserol 1,2-Propanediol Menggunakan Prosedur 2 Langkah dan 16 Langkah.*Kriobiologi***1994**,*31*, 415–422. [Referensi Silang]
52. Syamsuddin, M.; Rodriguez-Martinez, H. Struktur Halus Blastokista Sapi Dikembangkan Baik dalam Media Bebas Serum atau dalam Kultur Konvensional Dengan Sel Epitel Saluran Telur.*J.Dokter Hewan. medis. Ser. A***1994**,*41*, 307–316. [Referensi Silang]
53. Abe, H.; Hoshi, H. Evaluasi Embrio Sapi yang Diproduksi di Media Bebas Serum Berkinerja Tinggi.*J.Reproduksi. Dev.***2003**,*49*, 193–202. [Referensi Silang]
54. Sollecito, N.; Alves, R.; Beletti, M.; Pereira, E.; Miranda, M.; Silva, J.; Borges, A. Morfometri blastokista sapi yang diproduksi secara in vitro pada media kultur dengan antioksidan sistein atau ekstrak berminyak*Lippia origanoides.Arq. bra. medis. Dokter hewan. Zootec.***2021**,*73*, 799–811. [Referensi Silang]
55. Adil, T.; Penyendiri, P.; Dinnyes, A.; Cottell, DC; Hyttel, P.; Bangsal, FA; Boland, MP Ultrastruktur blastokista sapi setelah kriopreservasi: Pengaruh metode produksi blastokista.*mol. mereproduksi. Dev.***2001**,*58*, 186–195. [Referensi Silang]
56. Abe, H.; Otoi, T.; Tachikawa, S.; Yamashita, S.; Satoh, T.; Hoshi, H. Struktur halus morula sapi dan blastokista in vivo dan in vitro.*Anat. embrio.***1999**,*199*, 519–527. [Referensi Silang]
57. Tanaman, L.; King, WA Analisis mikroskopis cahaya dan elektron embrio sapi yang diperoleh melalui fertilisasi in Vitro dan in Vivo. *J.Membantu. mereproduksi. Genet.***1994**,*11*, 515–529. [Referensi Silang] [PubMed]
58. Nguyen, TH; Kandel, AKU; Rubessa, M.; Roda, MB; Popescu, G. Mikroskop interferensi cahaya gradien untuk pencitraan 3D spesimen tidak berlabel.*Nat. Komunitas.***2017**,*8*, 210.[Referensi Silang] [PubMed]
59. Sanderson, MJ; Smith, saya.; Parker, saya.; Bootman, MD Mikroskop Fluoresensi.*Pelabuhan Musim Semi Dingin. protokol.***2014**,*2014*, pdb.top071795. [Referensi Silang]
60. Specht, EA; Braselmann, E.; Palmer, AE Tinjauan Kritis dan Komparatif Alat Fluoresen untuk Pencitraan Sel Hidup.*Ann. Pendeta Fisiol.* **2017**,*79*, 93–117. [Referensi Silang] [PubMed]
61. Sakatani, M.; Kobayashi, S.-I.; Takahashi, M. Pengaruh sengatan panas pada perkembangan in vitro dan keadaan oksidatif intraseluler embrio praimplantasi sapi.*mol. mereproduksi. Dev.***2004**,*67*, 77–82. [Referensi Silang]
62. Wang, L.-J.; Zhang, H.; Wang, Y.-S.; Xu, W.-B.; Xiong, X.-R.; Li, Y.-Y.; Su, J.-M.; Hua, S.; Zhang, Y. Scriptaid meningkatkan pengembangan in vitro dan pemrograman ulang nuklir embrio sapi transfer nuklir sel somatik.*Sel. memprogram ulang.***2011**,*13*, 431–439. [Referensi Silang] [PubMed]
63. Slimane, W.; Haiman, Y.; Lavergne, Y.; Rendah hati, P.; Renard, JP Menilai Kelainan Kromosom pada Embrio Sapi Dua Sel yang Dibuahi Secara Vitro dengan Menggunakan Hibridisasi Fluoresen In Situ dengan Tiga Probe Kloning Berbeda.*biologi. mereproduksi.***2000**,*62*, 628–635. [Referensi Silang]
64. Daigneault, BW; Rajput, S.; Smith, GW; Ross, PJ Embryonic POU5F1 Diperlukan untuk Memperluas Formasi Bovine Blastocyst. *Sains. Reputasi.***2018**, *8*, 7753.[Referensi Silang]
65. Amos, WB; Putih, JG; Fordham, M. Penggunaan pencitraan confocal dalam studi struktur biologis.*Aplikasi. Memilih.***1987**,*26*, 3239–3243. [Referensi Silang]
66. Putih, JG; Amos, WB; Fordham, M. Evaluasi pencitraan struktur biologis confocal versus konvensional dengan mikroskop cahaya fluoresensi.*J. Biol. S.***1987**,*105*, 41–48. [Referensi Silang]

67. Inouya,S.*Buku Pegangan Mikroskop Confocal Biologis*; Pawley, JB, Ed.; Springer: New York, NY, AS, 2006.
68. Jonkman, J.; Coklat, CM; Wright, GD; Anderson, KI; Utara, Tutorial AJ: Panduan untuk mikroskop confocal kuantitatif.*Nat. protokol.***2020**, *15*, 1585–1611. [Referensi Silang] [PubMed]
69.Ross, PJ; Perez, GI; Ko, T.; Yoo, MS; Cibelli, JB Potensi perkembangan penuh embrio praimplantasi mamalia dipertahankan setelah pencitraan menggunakan mikroskop confocal disk berputar.*Bioteknik***2006**,*41*, 741–750. [Referensi Silang] [PubMed]
70. Wang, E.; Babbey, CM; Dunn, KW Perbandingan kinerja antara sistem confocal cakram pemintalan Yokogawa berkecepatan tinggi dan sistem confocal pemindaian titik tunggal.*J. Mikrosc.***2005**,*218*, 148–159. [Referensi Silang]
71. Byrne, A.; Gerbang Selatan, J.; Brison, DR; Leese, HJ Analisis apoptosis pada embrio sapi praimplantasi menggunakan TUNEL. *Reproduksi* **1999**,*117*, 97–105. [Referensi Silang] [PubMed]
72. Matwee, C.; Taruhan, DH; King, WA Apoptosis pada embrio sapi awal.*Zigot***1999**,*8*, 57–68. [Referensi Silang] [PubMed]
73. Vanroose, G.; Nauwynck, H.; Van Soom, A.; Ysebaert, M.-T.; Charlier, G.; Van Oostveldt, P.; de Kruif, A. Aspek Struktural Zona Pellucida Embrio Sapi yang Diproduksi In Vitro: Studi Mikroskopis Pemindaian Elektron dan Pemindaian Laser Confocal.*biologi. mereproduksi.* **2000**,*62*, 463–469. [Referensi Silang]
74. Pennetier, S.; Perreau, C.; Uzbekova, S.; Thyaitubohong, A.; Delaleu, B.; Mermillod, P.; Dalbiyas-Tran, ekspresi protein R. MATER dan lokalisasi intraseluler selama folikulogenesis dan perkembangan embrio praimplantasi pada sapi.*Pengembang BMC. biologi.* **2006**,*6*, 26.[Referensi Silang]
75. Hou, J.; Liu, L.; Lei, T.; Cui, X.; Sebuah, X.; Chen, Y. Pola metilasi DNA genom pada embrio praimplantasi sapi yang berasal dari fertilisasi in vitro.*Sains. Ilmu Kehidupan Cina.***2007**,*50*, 56–61. [Referensi Silang]
76. Wang, L.; Feng, H.; Mungkin.; Cang, M.; Li, H.; Yan, Z.; Zhou, P.; Wen, J.; Bou, S.; Liu, D. Ekspresi reseptor IGF dan ligannya pada oosit sapi dan embrio praimplantasi.*animasi. mereproduksi. Sains.***2009**,*114*, 99–108. [Referensi Silang]
77. Kuijk, Barat; van Tol, LTA; Van de Velde, H.; Wubbolts, R.; baik, M.; Geijsen, N.; Roelen, BAJ Peran sinyal FGF dan MAP kinase dalam pemisahan garis keturunan sel epiblas dan hipoblas pada embrio sapi dan manusia.*Perkembangan***2012**, *139*, 871–882. [Referensi Silang] [PubMed]
78. Madeja, ZE; Sosnowski, J.; Hryniewicz, K.; Warzych, E.; Pawlak, P.; Rozwadowska, N.; Ditambah, B.; Lechniak, D. Perubahan lokalisasi subseluler trofoblas dan faktor transkripsi spesifik massa sel dalam selama pengembangan praimplantasi sapi. *Pengembang BMC. biologi.***2013**,*13*, 32.[Referensi Silang]
79. Simmet, K.; Zakhartchenko, V.; Philippou-Massier, J.; Blum, H.; Klymiuk, N.; Wolf, E. OCT4/POU5F1 diperlukan untuk ekspresi NANOG pada blastokista sapi.*Proses. Natal. Akademik. Sains. Amerika Serikat***2018**,*115*, 2770–2775. [Referensi Silang] [PubMed]
80. Khan, DR; Menjulukiya,D.; Empedu, L.; Peynot, N.; Ruffini, S.; Laffont, L.; Le Bourhis, D.; Degrelle, S.; Jouneau, A.; Duranthon, V. Ekspresi pengatur utama pluripotensi selama dua transisi perkembangan utama: Ega dan spesifikasi garis keturunan awal pada embrio sapi. *PLoS SATU***2012**,*7*, e34110. [Referensi Silang] [PubMed]
81. Yao, T.; Suzuki, R.; Furuta, N.; Suzuki, Y.; Kabe, K.; Tokoro, M.; Sugawara, A.; Yajima, A.; Nagasawa, T.; Matoba, S.; dkk. Pencitraan sel hidup dinamika nuklir-kromosom pada embrio sapi yang dibuahi in vitro.*Sains. Reputasi.***2018**,*8*, 7460.[Referensi Silang] [PubMed]
82. Mesalam, A.; Lee, K.-L.; Khan, aku.; Chowdhury, MMR; Zhang, S.; Lagu, S.-H.; Joo, M.-D.; Lee, J.-H.; Jin, J.-I.; Kong, I.-K. Kombinasi albumin serum sapi dengan insulin-transferrin-natrium selenit dan/atau faktor pertumbuhan epidermal sebagai alternatif serum janin sapi dalam media kultur meningkatkan kualitas embrio sapi dan invasi trofoblas dengan induksi matriks metaloproteinase.*mereproduksi. Subur. Dev.***2019**,*31*, 333–346. [Referensi Silang]
83. Monteiro, CAS; Chow, DJ; Leal, GR; Tan, TC; Ferreira, AMR; Thompson, JG; Dunning, KR Pencitraan optik embrio sapi tahap pembelahan menggunakan pendekatan hiperspektral dan confocal mengungkapkan perbedaan metabolik antara embrio tepat waktu dan embrio yang berkembang cepat.*Teriogenologi***2020**,*159*, 60–68. [Referensi Silang]
84. Tupai, JM; Wokosin, DL; Putih, JG; Bavister, BD Pencitraan fluoresensi dua foton jangka panjang pada embrio mamalia tanpa mengurangi kelangsungan hidupnya.*Nat. Bioteknologi.***1999**,*17*, 763–767. [Referensi Silang]
85. Centonze, VE; White, Eksitasi Multiphoton JG Menyediakan Bagian Optik dari Spesimen Hamburan yang Lebih Dalam daripada Pencitraan Confocal.*Biofisika. J.***1998**,*75*, 2015–2024. [Referensi Silang]
86. Kamu, S.; Tu, H.; Chaney, EJ; Matahari, Y.; Zhao, Y.; Bower, AJ; Liu, Y.-Z.; Marjanovic, M.; Sinha, S.; Pu, Y.; dkk. Pencitraan intravital dengan mikroskop autofluoresensi-multiharmonik bebas label secara simultan.*Nat. Komunitas.***2018**,*9*, 2125.[Referensi Silang]
87. Yadlowsky, MJ; Schmitt, JM; Bonner, RF Beberapa hamburan dalam mikroskop koherensi optik.*Aplikasi. Memilih.***1995**,*34*, 5699–5707. [Referensi Silang] [PubMed]
88. Rivenson, Y.; Ozcan, A. Pembelajaran mendalam mempercepat pencitraan seluruh slide untuk aplikasi patologi digital generasi berikutnya.*Lampu. Sains. Aplikasi.***2022**,*11*, 300. [Referensi Silang]
89. Welte, MA Saat lemak terbang: Tetesan lipid dinamis embrio Drosophila.*Biokimia. Biofisika. Akta (BBA)-Mol. Biol Sel. Lemak* **2015**,*1851*, 1156–1185. [Referensi Silang] [PubMed]
90. Malaikat-Velez, D.; De Coster, T.; Azari-Dolatabad, N.; PakisAndez-Montoro, A.; Benedetti, C.; Pavani, K.; Van Soom, A.; Pascottini, OB; Smits, K. Morfokinetik embrio yang berasal dari oosit sapi segar dan vitrifikasi memprediksi perkembangan blastokista dan kelainan nuklir.*Sains. Reputasi.***2023**,*13*, 4765.[Referensi Silang] [PubMed]
91. Magata, F. Teknologi pemantauan selang waktu untuk pemilihan embrio sapi yang dibuahi in vitro dengan potensi implantasi tinggi. *J.Reproduksi. Dev.***2023**,*69*, 57–64. [Referensi Silang]
92. Massip, A.; Mulnard, J. Analisis sinematografi selang waktu penetasan blastokista sapi normal dan beku-cair. *Reproduksi***1980**,*58*, 475–478. [Referensi Silang] [PubMed]

93. Massip, A.; Mulnard, J.; Vanderzwalmen, P.; Hanzen, C.; Ectors, F. Perilaku blastokista sapi in vitro: Analisis sinematografi dan morfometrik.*J.Anat.***1982**,*134*, 399–405.
94. Sugimura, S.; Akai, T.; Hashiyada, Y.; Somfai, T.; Inaba, Y.; Hirayama, M.; Yamanouchi, T.; Matsuda, H.; Kobayashi, S.; Aikawa, Y.; dkk. Sistem yang Menjanjikan untuk Memilih Embrio Sehat yang Dibuahi Secara In Vitro pada Sapi.*PLoS SATU***2012**,*7*, e36627. [Referensi Silang]
95. Sugimura, S.; Akai, T.; Imai, K. Seleksi embrio sapi yang dibuahi secara in vitro dan layak menggunakan pemantauan selang waktu dalam cawan kultur microwell.*J.Reproduksi. Dev.***2017**,*63*, 353–357. [Referensi Silang]
96. Hardin, J. Pencitraan Confocal dan Multi-Foton Embrio Hidup. Di dalam*Buku Pegangan Mikroskop Confocal Biologis*; Pawley, JB, Ed.; Springer: Boston, MA, AS, 2006; hal.746–768.
97.Holm, P.; Syukri, N.; Vajta, G.; Stan, P.; Bendixen, C.; Callesen, H. Kinetika perkembangan siklus sel pertama sapi in vitro menghasilkan embrio dalam kaitannya dengan kelangsungan hidup in vitro dan jenis kelaminnya.*Teriogenologi***1998**,*50*, 1285–1299. [Referensi Silang]
98. Majerus, V.; Lequarrya,SEBAGAI; Ferguson, EM; Kaidi, S.; Massip, A.; Dessy, F.; Donnay, I. Karakterisasi embrio yang berasal dari betis oosit: Kinetika pembelahan, alokasi sel ke massa sel bagian dalam, dan metabolisme trofektoderm dan lipid.*mol. mereproduksi. Dev.* **2000**,*57*, 346–352. [Referensi Silang] [PubMed]
99. Yoshioka, K.; Suzuki, C.; Iwamura, S. Pengaruh aktivin A dan follistatin pada kinetika perkembangan embrio sapi: Analisis sinematografi dalam media yang ditentukan secara kimia.*J.Reproduksi. Subur.***2000**,*118*, 119–126. [Referensi Silang] [PubMed]
100. Peippo, J.; Kurkilahti, M.; Bredbacka, P. Kinetika perkembangan embrio sapi yang diproduksi secara in vitro: Pengaruh jenis kelamin, glukosa dan paparan lingkungan selang waktu.*Zigot***2001**,*9*, 105–113. [Referensi Silang] [PubMed]
101.Holm, P.; Stan, PJ; Callesen, H. Kinetika perkembangan awal in vitro zigot turunan sapi in vivo dan in vitro yang diproduksi dan/atau dikultur dalam media yang ditentukan secara kimia atau mengandung serum.*Reproduksi***2002**,*123*, 553–565. [Referensi Silang]
102. Lequarre, A.; Marchandise, J.; Moreau, B.; Massip, A.; Donnay, I. Durasi Siklus Sel pada Saat Transisi Zigotik Ibu untuk Embrio Sapi yang Diproduksi In Vitro: Pengaruh Ketegangan Oksigen dan Penghambatan Transkripsi.*biologi. mereproduksi.***2003**,*69*, 1707–1713. [Referensi Silang]
103. Somfai, T.; Inaba, Y.; Aikawa, Y.; Oh ambil, M.; Kobayashi, S.; Konishi, K.; Imai, K. Hubungan antara lamanya siklus sel, pola pembelahan dan kompetensi perkembangan embrio sapi yang dihasilkan melalui fertilisasi in vitro atau partenogenesis. *J.Reproduksi. Dev.***2010**,*56*, 200–207. [Referensi Silang]
104. Sugimura, S.; Akai, T.; Somfai, T.; Hirayama, M.; Aikawa, Y.; Oh ambil, M.; Hattori, H.; Kobayashi, S.; Hashiyada, Y.; Konishi, K.; dkk. Sistem kultur microwell berbasis polistiren yang kompatibel dengan sinematografi selang waktu: Alat baru untuk melacak perkembangan embrio sapi individu.*biologi. mereproduksi.***2010**,*83*, 970–978. [Referensi Silang]
105. Magata, F.; Idea, A.; Okubo, H.; Matsuda, F.; Urakawa, M.; Oono, Y. Potensi pertumbuhan embrio sapi dengan belahan dada abnormal yang diamati melalui sinematografi time lapse.*Teriogenologi***2019**,*133*, 119–124. [Referensi Silang]
106. Magata, F.; Urakawa, M.; Matsuda, F.; Oono, Y. Kinetika perkembangan dan kelangsungan hidup embrio sapi yang diproduksi secara in vitro dengan air mani yang disortir berdasarkan jenis kelamin.*Teriogenologi***2020**,*161*, 243–251. [Referensi Silang]
107. Suzuki, R.; Okada, M.; Nagai, H.; Kobayashi, J.; Sugimura, S. Analisis morfokinetik pronukleus menggunakan sinematografi time-lapse pada zigot sapi.*Teriogenologi***2021**,*166*, 55–63. [Referensi Silang]
108. Lechniak, D.; Jual-Kubiak, E.; Warzych, E. Profil metabolik blastokista sapi dipengaruhi oleh sistem kultur in vitro dan pola pembelahan zigotik pertama.*Teriogenologi***2022**,*188*, 43–51. [Referensi Silang]
109. Yaacobi-Artzi, S.; Kalo, D.; Roth, Z. Hubungan antara morfokinetik embrio sapi yang diturunkan secara in-vitro dan profil transkriptomik dari blastokista turunan.*PLoS SATU***2022**,*17*, e0276642. [Referensi Silang] [PubMed]
110. Verlinsky, Y.; Pergamen, E.; Strom, C. Diagnosis genetik praimplantasi penyakit genetik.*J.Membantu. mereproduksi. Genet.***1990**,*7*, 1–5. [Referensi Silang] [PubMed]
111. Gardner, RL; Edwards, RG Mengontrol Rasio Jenis Kelamin pada Masa Penuh pada Kelinci dengan mentransfer Sexed Blastocysts.*Alam***1968**, *218*, 346–348. [Referensi Silang] [PubMed]
112. Herr, C.; Reed, K. Mikronanipulasi embrio sapi untuk penentuan jenis kelamin.*Teriogenologi***1991**,*35*, 45–54. [Referensi Silang]
113. Leonard, M.; Kirszenbaum, M.; Cotinot, C.; Chesne, P.; Haiman, Y.; Stinnakre, M.; Uskup, C.; Delouis, C.; Vaiman, M.; Fellous, M. Sexing embrio sapi menggunakan probe DNA spesifik kromosom Y.*Teriogenologi***1987**,*27*, 248.[Referensi Silang]
114. Bondioli, K.; Ellis, S.; Pryor, J.; Williams, M.; Harpold, M. Penggunaan fragmen DNA kromosom spesifik jantan untuk menentukan jenis kelamin embrio praimplantasi sapi.*Teriogenologi***1989**,*31*, 95–104. [Referensi Silang]
115. Mullis, KB Asal usul reaksi berantai polimerase yang tidak biasa.*Sains. Saya.***1990**,*262*, 56–65. [Referensi Silang]
116. Machaty, Z.; Paldi, A.; Csaki, T.; Varga, Z.; Cium, aku.; BARAdan, Z.; Vajta, G. Biopsi dan penentuan jenis kelamin dengan PCR embrio sapi IVF. *Reproduksi***1993**,*98*, 467–470. [Referensi Silang]
117. Taman, J.; Lee, J.; Choi, K.; Joung, S.; Kim, J.; Chung, G.; Jin, D.; Im, K. Sexing cepat embrio sapi praimplantasi menggunakan reaksi berantai polimerase (PCR) berturut-turut dan multipleks dengan blastomer tunggal yang dibiopsi.*Teriogenologi***2001**,*55*, 1843–1853. [Referensi Silang]
118. Chrenek, P.; Boulanger, L.; Haiman, Y.; Uhrin, P.; Laurincik, J.; Bulla, J.; Renard, J.-P. Analisis jenis kelamin dan beberapa genotipe dari satu sel embrio sapi.*Teriogenologi***2001**,*55*, 1071–1081. [Referensi Silang] [PubMed]
119. Chen, CM; Hu, CL; Wang, CH; Digantung, CM; Wu, HK; Choo, KB; Cheng, WTK Penentuan gender dalam blastomer sapi tunggal dengan amplifikasi reaksi berantai polimerase dari fragmen polimorfik spesifik jenis kelamin pada gen amelogenin.*mol. mereproduksi. Dev.* **1999**,*54*, 209–214. [Referensi Silang]

120. Wrenzycki, C.; Herrmann, D.; Carnwath, JW; Niemann, H. Ekspresi gen gap gap connexin43 (Cx43) pada embrio sapi praimplantasi yang diturunkan secara in vitro atau in vivo.*Reproduksi*.**1996**,*108*, 17–24. [Referensi Silang] [PubMed]
121. Vigneault, C.; McGraw, S.; Massicotte, L.; Tuan, M.-A. Pola Ekspresi Faktor Transkripsi pada Embrio Turunan Sapi In Vitro Sebelum Transisi Ibu-Zigotik.*biologi. mereproduksi.***2004**,*70*, 1701–1709. [Referensi Silang] [PubMed]
122. Perez, VMN; Zhang, Y.; Hansen, PJ Ekspresi gen sel tunggal dari blastokista sapi.*Reproduksi*.**2017**,*154*, 627–644. [Referensi Silang]
123. Mundim, T.; Ramos, A.; Sartori, R.; Dode, M.; Melo, E.; Gomes, L.; pantat, R.; Franco, M. Perubahan profil ekspresi gen embrio sapi yang diproduksi secara in vitro, melalui ovulasi alami, atau superstimulasi hormonal.*Genet. mol. Res.***2009**,*8*, 1398–1407. [Referensi Silang] [PubMed]
124. Ponsart, C.; Le Bourhis, D.; Knijn, H.; Fritz, S.; Guyader-Joly, C.; Berang-berang, T.; Lacaze, S.; Charreaux, F.; Schibler, L.; Dupassieux, D.; dkk. Teknologi reproduksi dan seleksi genom pada sapi perah.*mereproduksi. Subur. Dev.***2014**,*26*, 12–21. [Referensi Silang]
125. Mullaart, E.; Wells, D. Biopsi embrio untuk seleksi genom. Di dalam*Bioteknologi Hewan 2: Teknologi Pemuliaan yang Muncul*; Springer: Berlin, Jerman, 2018; hal.81–94.
126. de Sousa, RV; Cardoso, CRDS; Butzke, G.; Dode, MAN; pantat, R.; Franco, MM Biopsi embrio sapi yang diproduksi secara in vivo dan in vitro tidak mempengaruhi tingkat kebuntingan.*Teriogenologi*.**2017**,*90*, 25–31. [Referensi Silang]
127. Nelayan, PJ; Hyndman, DL; Bixley, MJ; Oback, FC; Popovic, L.; McGowan, LT; Berg, MC Potensi seleksi genom embrio sapi. Dalam Prosiding Masyarakat Produksi Hewan Selandia Baru; Masyarakat Produksi Hewan Selandia Baru: Christchurch, Selandia Baru, 2012; hal.156–158.
128. Reimand, J.; Isserlin, R.; Voisin, V.; Kucera, M.; Tannus-Lopes, C.; Rostamianfar, A.; Wadi, L.; Meyer, M.; Wong, J.; Xu, C.; dkk. Analisis pengayaan jalur dan visualisasi data omics menggunakan g:Profiler, GSEA, Cytoscape dan EnrichmentMap.*Nat. protokol.* **2019**,*14*, 482–517. [Referensi Silang]
129. Pas, MFWT; van Hemert, S.; Hulsegge, B.; Hoekman, AJW; Kolam Renang, MH; Pemberontak, JMJ; Smits, MA Alat analisis jalur untuk menganalisis data microarray spesies dengan informasi fisiologis rendah.*Adv. Bioinformasi.***2008**,*2008*, 719468.[Referensi Silang]
130. Scott, B.; Haile-Mariam, M.; Ayam, B.; Pryce, J. Bagaimana seleksi genom telah meningkatkan laju perolehan genetik dan perkawinan sedarah pada kawanan nasional Australia, inti informasi genom, dan pejantan.*J. Ilmu Susu.***2021**,*104*, 11832–11849. [Referensi Silang]
131. Retalick, KJ; Lu, D.; Garcia, A.; Miller, SP Seleksi Genomic di AS: Kemana saja dan ke mana arahnya? Dalam Prosiding Kongres Dunia ke-12 tentang Genetika yang Diterapkan pada Produksi Ternak (WCGALP), Rotterdam, Belanda, 3–8 Juli 2022; hal.1795–1798.
132. Silvestri, G.; Canedo-Ribeiro, C.; Serrano-Albal, M.; Labreque, R.; pirang, P.; Larmer, SG; Marras, G.; Tutt, DA; Sisi praktis, AH; Jauhya,M.; dkk. Pengujian Genetik Praimplantasi untuk Aneuploidi Meningkatkan Angka Kelahiran Hidup dengan Embrio Sapi yang Diproduksi Secara In Vitro: Sebuah Studi Retrospektif Buta.*Sel*.**2021**,*10*, 2284.[Referensi Silang]
133. Herrera, C. Aplikasi Klinis Pengujian Genetik Praimplantasi pada Embrio Kuda, Sapi, dan Manusia.*J. Kuda Veter. Sains.* **2016**,*41*, 29–34. [Referensi Silang]
134. Saadi, TELAH; Vigneault, C.; Sargolzaei, M.; Gaganya,D.; Fournier,É.;de Montera, B.; Chesnais, J.; pirang, P.; Robert, C. Dampak amplifikasi seluruh genom terhadap keandalan perkiraan nilai pemuliaan embrio sapi sebelum transfer.*Genom BMC.***2014**,*15*, 889.[Referensi Silang] [PubMed]
135. Turner, KJ; Silvestri, G.; Hitam, DH; Dobson, G.; Smith, C.; Sisi praktis, AH; Sinclair, KD; Griffin, DK Karyomapping untuk evaluasi genom secara simultan dan skrining aneuploidi embrio sapi praimplantasi: Anak sapi pertama yang lahir hidup. *Teriogenologi* **2018**,*125*, 249–258. [Referensi Silang] [PubMed]
136. Tutt, D.; Silvestri, G.; Serrano-Albal, M.; Simmons, R.; Kwong, W.; Guven-Ates, G.; Canedo-Ribeiro, C.; Labreque, R.; pirang, P.; Sisi praktis, A.; dkk. Analisis blastokista sapi menunjukkan stimulasi ovarium tidak menyebabkan kesalahan kromosom, atau ketidaksesuaian antara massa sel dalam dan garis keturunan trofektoderm.*Teriogenologi*.**2020**,*161*, 108–119. [Referensi Silang] [PubMed]
137. Bouwman, AC; Mullaart, E. Skrining embrio sapi yang diproduksi secara in vitro untuk menilai kejadian dan karakteristik penyimpangan kromosom yang tidak seimbang.*Komunitas JDS.***2023**,*4*, 101–105. [Referensi Silang] [PubMed]
138. Masset, H.; Ding, J.; Dimitriadou, E.; Ardeshirdavani, A.; Debrock, S.; Tšuiko, O.; Smits, K.; Rekan, K.; Moreau, Y.; Voet, T.; dkk. Haplotyping bersamaan di seluruh genom sel tunggal dan pembuatan profil nomor salinan melalui genotyping-by-sequencing.*Asam Nukleat Res.***2022**,*50*, e63. [Referensi Silang]
139. Griffin, DK; Jturner, K.; Silvestri, G.; Smith, C.; Dobson, G.; Hitam, DH; Sinclair, KD; Handyside, AH Penggunaan Karyomapping untuk evaluasi genom dan PGT-A embrio sapi praimplantasi: Anak sapi pertama yang lahir hidup.*mereproduksi. Bioma. On line***2019**,*38*, e54–e55. [Referensi Silang]
140. Mohan, M.; Ryder, S.; Claypool, P.; Geisert, R.; Malayer, J. Analisis Ekspresi Gen pada Bovine Blastocyst yang Diproduksi In Vitro Menggunakan Hibridisasi Supresi-Subtraktif.*biologi. mereproduksi.***2002**,*67*, 447–453. [Referensi Silang]
141. Mohan, M.; Sakit, A.; Malayer, J. Analisis ekspresi gen global membandingkan blastokista sapi yang dikeluarkan pada hari ke 7 atau diproduksi secara in vitro.*mol. mereproduksi. Dev.***2004**,*68*, 288–298. [Referensi Silang]
142. Corcoran, D.; Adil, T.; Rizos, D.; Smith, G.; Coussens, P.; Patel, O.; Irlandia, J.; Boland, M.; Evans, A.; Lonergan, P. 216 Identifikasi Gen yang Diekspresikan Secara Berbeda pada Embrio Sapi yang Dibiakkan Secara In Vivo atau In Vitro.*mereproduksi. Subur. Dev.***2005**,*17*, 259.[Referensi Silang]
143. Corcoran, D.; Adil, T.; Taman, S.; Rizos, D.; Patel, OV; Smith, GW; Coussens, PM; Irlandia, JJ; Boland, anggota parlemen; Evans, ACO; dkk. Penekanan ekspresi gen yang terlibat dalam transkripsi dan translasi in vitro dibandingkan dengan embrio sapi yang dikultur in vivo. *Reproduksi*.**2006**,*131*, 651–660. [Referensi Silang] [PubMed]

144. Valyaitue, M.; Dufort, saya.; Desrosier, S.; Labbe, A.; Kerikil, C.; Gilbert, saya.; Robert, C.; Tuan, M.-A. Mengungkap profil transkrip embrio sapi selama awal perkembangan embrio in vivo.*Reproduksi***2009**,*138*, 95–105. [Referensi Silang] [PubMed]
145. El-Sayed, A.; Hoelker, M.; Cincin, F.; Salilew, D.; Jennen, D.; Tholen, E.; Tuan, M.-A.; Schellander, K.; Tesfaye, D. Analisis transkripsi skala besar biopsi embrio sapi dalam kaitannya dengan keberhasilan kehamilan setelah transfer ke penerima.*Fisiol. Genom.* **2006**,*28*, 84–96. [Referensi Silang]
146. Ghanem, N.; Wondim, DS; Gad, A.; Tesfaye, D.; Phatsara, C.; Tholen, E.; Loteng, C.; Schellander, K.; Hoelker, M. Blastokista sapi dengan kompetensi perkembangan pada istilah tersebut memiliki ekspresi serupa dari gen-gen penting perkembangan meskipun berasal dari lingkungan budaya yang berbeda.*Reproduksi***2011**,*142*, 551–564. [Referensi Silang]
147. Hoelker, M.; Cincin, F.; Lund, Q.; Ghanem, N.; Phatsara, C.; Griese, J.; Schellander, K.; Tesfaye, D. Pengaruh lingkungan mikro dan kepadatan embrio terhadap karakteristik perkembangan dan profil ekspresi gen embrio preimplantatif sapi yang dikultur in vitro. *Reproduksi***2009**,*137*, 415–425. [Referensi Silang]
148.KepkovA,KV; Vodicka, P.; Toralova, T.; Lopatarova, M.; Cech, S.; Dolezel, R.; Havlicek, V.; Besenfelder, U.; Kuzmany, A.; Tuan, MA; dkk. Analisis transkriptomik embrio sapi yang diproduksi in vivo dan in vitro mengungkapkan perubahan perkembangan ekspresi cullin 1 selama transisi dari ibu ke embrio.*Teriogenologi***2011**,*75*, 1582–1595. [Referensi Silang]
149. Labrecque, R.; Tuan, M.-A. Analisis ekspresi gen blastokista sapi yang dihasilkan oleh aktivasi atau fertilisasi partenogenik. *mereproduksi. Subur. Dev.***2011**,*23*, 591–602. [Referensi Silang]
150. Sudano, MJ; Caixeta, ES; Paschoal, DM; Rascado, TS; Crocomo, LF; Maziero, RR; MagalhAya, LCO; Guastali, MD; Vergara, LE; Monteiro, BA; dkk. Analisis Microarray Embrio Sapi yang Diproduksi In Vitro dengan Phenazine Ethosulfate.*biologi. mereproduksi.***2012**,*87*, 215.[Referensi Silang]
151. Sudano, MJ; Paschoal, DM; Caixeta, ES; Maziero, RR; Guastali, MD; Crocomo, LF; Rascado, TS; MagalhAya, LCO; Monteiro, BA; Martins, A.; dkk. 82 Pengaruh Konsentrasi Serum Anak Sapi Janin yang Tinggi terhadap Pola Ekspresi Gen Embrio Sapi Produksi In Vitro. *mereproduksi. Subur. Dev.***2013**,*26*, 155.[Referensi Silang]
152. Misirlioglu, M.; Halaman, dokter umum; Sagirkaya, H.; Kaya, A.; Parrish, JJ; Pertama, NL; Memili, E. Dinamika transkriptome global pada oosit sapi matang dan embrio praimplantasi.*Proses. Natal. Akademik. Sains. Amerika Serikat***2006**,*103*, 18905–18910. [Referensi Silang]
153. Kues, WA; Sudheer, S.; Herrmann, D.; Carnwath, JW; Havlicek, V.; Besenfelder, U.; Lehrach, H.; Adjaye, J.; Niemann, H. Profil ekspresi genom mengungkapkan kelompok regulasi transkripsional yang berbeda selama pengembangan praimplantasi sapi in vivo.*Proses. Natal. Akademik. Sains. Amerika Serikat***2008**,*105*, 19768–19773. [Referensi Silang]
154. Carter, F.; Cincin, F.; Mamo, S.; Hölker, M.; Kuzmany, A.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Mehta, JP; Tesfaye, D.; Schellander, K.; dkk. Pengaruh peningkatan konsentrasi progesteron yang bersirkulasi pada perkembangan blastokista sapi dan transkriptom global setelah transfer endoskopi embrio yang diproduksi secara in vitro ke saluran telur sapi.*biologi. mereproduksi.***2010**,*83*, 707–719. [Referensi Silang] [PubMed]
155. Huang, W.; Yandell, BS; Khatib, H. Profil transkriptomik embrio IVF sapi mengungkapkan kandidat gen dan jalur yang terlibat dalam perkembangan embrio awal.*Genom BMC.***2010**,*11*, 23.[Referensi Silang]
156. Bermejo-Alvarez, P.; Rizos, D.; Rath, D.; Penyendiri, P.; Gutierrez-Adan, A. Jenis kelamin menentukan tingkat ekspresi sepertiga gen yang diekspresikan secara aktif dalam blastokista sapi.*Proses. Natal. Akademik. Sains. Amerika Serikat***2010**,*107*, 3394–3399. [Referensi Silang] [PubMed]
157. Salilew-Wondim, D.; Hölker, M.; Cincin, F.; Ghanem, N.; Ulas-Cinar, M.; Peipo, J.; Tholen, E.; Loteng, C.; Schellander, K.; Tesfaye, D. Bovine pretransfer endometrium dan sidik jari transkriptome embrio sebagai prediktor keberhasilan kehamilan setelah transfer embrio. *Fisiol. Genom.***2010**,*42*, 201–218. [Referensi Silang]
158. Gad, A.; Besenfelder, U.; Cincin, F.; Ghanem, N.; Salilew-Wondim, D.; Hossain, M.; Tesfaye, D.; Penyendiri, P.; Becker, A.; Cinar, U.; dkk. Pengaruh lingkungan saluran reproduksi setelah pengobatan hiperstimulasi ovarium terkontrol pada perkembangan embrio dan profil transkriptome global blastokista: Implikasi terhadap pembiakan hewan dan reproduksi yang dibantu manusia. *Bersenandung. mereproduksi.***2011**,*26*, 1693–1707. [Referensi Silang]
159. Clemente, M.; Lopez-Vidriero, I.; O'Gaora, P.; Mehta, J.; Ford, N.; Gutierrez-Adan, A.; Penyendiri, P.; Rizos, D. Perubahan Transkriptome pada Inisiasi Pemanjangan Konseptus Sapi.*biologi. mereproduksi.***2011**,*85*, 285–295. [Referensi Silang] [PubMed]
160. Nagatomo, H.; Kagawa, S.; Kishi, Y.; Takuma, T.; Sada, A.; Yamanaka, K.-I.; Abe, Y.; Wada, Y.; Takahashi, M.; Kono, T.; dkk. Pengkabelan Transkripsional untuk Menetapkan Spesifikasi Silsilah Sel pada Tahap Blastokista pada Sapi.*biologi. mereproduksi.***2013**,*88*, 158.[Referensi Silang] [PubMed]
161. Gad, A.; Hoelker, M.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Cinar, U.; Cincin, F.; Diadakan, E.; Dufort, saya.; Tuan, MA; Schellander, K.; dkk. Mekanisme dan Jalur Molekuler yang Terlibat dalam Aktivasi Genom Embrionik Sapi dan Regulasinya dengan Kondisi Kultur Alternatif In Vivo dan In Vitro.*biologi. mereproduksi.***2012**,*87*, 100. [Referensi Silang] [PubMed]
162. Cagnone, G.; Dufort, saya.; Vigneault, C.; Tuan, M.-A. Profil Ekspresi Gen Diferensial pada Blastokista Sapi Akibat Paparan Hiperglikemia Pada Tahap Pembelahan Awal.*biologi. mereproduksi.***2012**,*86*, 50. [Referensi Silang] [PubMed]
163. Cagnone, GL; Tuan, M.-A. Tanda tangan transkriptomik terhadap paparan stres oksidatif pada saat aktivasi genom embrionik pada blastokista sapi.*mol. mereproduksi. Dev.***2013**,*80*, 297–314. [Referensi Silang] [PubMed]
164. Hosseini, SM; Dufort, saya.; Caballero, J.; Moulavi, F.; Ghanaei, HR; Sirard, MA Profil transkriptome massa sel bagian dalam sapi dan trofektoderm yang berasal dari blastokista yang dihasilkan secara in vivo.*Pengembang BMC. biologi.***2015**,*15*, 49.[Referensi Silang] [PubMed]
165. Desmet, KLJ; Van Hoeck, V.; Gaganya,D.; Fournier, E.; Thakur, A.; O'doherty, AM; Walsh, CP; Tuan, MA; Bol, PEJ; Leroy, JLMR Paparan oosit dan embrio sapi terhadap peningkatan konsentrasi asam lemak non-esterifikasi: Integrasi tanda tangan epigenetik dan transkriptomik dalam blastokista yang dihasilkan.*Genom BMC.***2016**,*17*, 1004.[Referensi Silang]

166. Gupta, A.; Singh, J.; Dufort, saya.; Robert, C.; Dias, F.; Anzar, M. Perbedaan transkriptomik pada blastokista sapi setelah vitrifikasi dan pembekuan lambat pada tahap morula.*PLoS SATU***2017**,*12*, e0187268. [Referensi Silang]
167. Wu, C.; pirang, P.; Vigneault, C.; Labreque, R.; Tuan, M.-A. Usia sapi jantan mempengaruhi transkriptom dan epigenom blastokista yang dihasilkan oleh IVF.*Teriogenologi***2019**,*144*, 122–131. [Referensi Silang]
168. Salilew-Wondim, D.; Tesfaye, D.; Cincin, F.; Diadakan-Hoelker, E.; Miskel, D.; Tuan, M.-A.; Tholen, E.; Schellander, K.; Hoelker, M. Garis besar ekspresi gen global blastokista sapi: Reflektor kondisi lingkungan dan prediktor kapasitas perkembangan.*Genom BMC.***2021**,*22*, 408.[Referensi Silang]
169. Hallberg, I.; Orang, S.; Olovsson, M.; Tuan, M.-A.; Damdimopoulou, P.; Ruegg, J.; Sjunnesson, YC Perfluorooctane sulfonate (PFOS) paparan oosit sapi mempengaruhi perkembangan embrio awal pada tingkat yang relevan dengan manusia dalam model in vitro.*Toksikologi* **2021**,*464*, 153028.[Referensi Silang]
170. Rabaglino, MB; Salilew-Wondim, D.; Zolini, A.; Tesfaye, D.; Hoelker, M.; Penyendiri, P.; Hansen, PJ Metode pembelajaran mesin diterapkan pada data transkriptomik terintegrasi dari blastokista sapi dan pemanjangan konsepsi untuk mengidentifikasi gen yang memprediksi kompetensi embrio.*FASEB J.***2023**,*37*, e22809. [Referensi Silang]
171. Brinkhof, B.; Van Tol, HTA; Koerkamp, MJAG; Wubbolt, RW; Haagsman, HP; Roelen, BAJ Karakterisasi embrio sapi yang dikultur dalam kondisi yang sesuai untuk mempertahankan potensi majemuk naif manusia.*PLoS SATU***2017**,*12*, e0172920. [Referensi Silang]
172. Ushizawa, K.; Herath, CB; Kaneyama, K.; Shiojima, S.; Hirasawa, A.; Takahashi, T.; Imai, K.; Ochiai, K.; Tokunaga, T.; Tsunoda, Y.; dkk. analisis microarray cDNA profil ekspresi gen embrio sapi selama periode pra-implantasi. *mereproduksi. biologi. Endokrinol.***2004**,*2*, 77.[Referensi Silang]
173. Smith, SL; Evert, RE; Tian, XC; Du, F.; Dinyanyikan, L.-Y.; Rodriguez-Zas, SL; Jeong, B.-S.; Renard, J.-P.; Lewin, HA; Yang, X. Profil ekspresi gen global mengungkapkan pemrograman ulang nuklir yang signifikan pada tahap blastokista setelah kloning.*Proses. Natal. Akademik. Sains. Amerika Serikat* **2005** ,*102*, 17582–17587. [Referensi Silang]
174. Pfister-Genskow, M.; Myers, C.; Anak-anak, LA; Lacson, JC; Patterson, T.; Betthauser, JM; Goueleke, PJ; Koppang, RW; Lange, G.; Nelayan, P.; dkk. Identifikasi Gen yang Diekspresikan Secara Berbeda pada Embrio Praimplantasi Sapi Individu yang Dihasilkan oleh Transfer Nuklir: Pemrograman Ulang Gen yang Tidak Benar yang Diperlukan untuk Pengembangan.*biologi. mereproduksi.***2005**,*72*, 546–555. [Referensi Silang]
175. Somers, J.; Smith, C.; Donnison, M.; Sumur, D.; Henderson, H.; McLeay, L.; Pfeffer, P. Profil ekspresi gen blastokista transfer inti sapi individu.*Reproduksi***2006**,*131*, 1073–1084. [Referensi Silang] [PubMed]
176. Wang, C.; Gong, B.; Gantang, PR; Thierry-Mieg, J.; Thierry-Mieg, D.; Xu, J.; Fang, H.; Hong, H.; Shen, J.; Su, Z.; dkk. Kesesuaian antara data RNA-seq dan microarray bergantung pada perlakuan kimia dan kelimpahan transkrip.*Nat. Bioteknologi.* **2014**,*32*, 926–932. [Referensi Silang] [PubMed]
177. Rao, MS; Van Vleet, TR; Ciurlionis, R.; Uang, WR; Mittelstadt, SW; Selamat, EAG; Liguori, MJ Perbandingan Platform Ekspresi Gen RNA-Seq dan Microarray untuk Evaluasi Toksikogenomik Hati dari Studi Toksisitas Tikus Jangka Pendek. *Depan. Genet.***2019**,*9*, 636.[Referensi Silang] [PubMed]
178. Huang, W.; Khatib, H. Perbandingan lanskap transkriptomik embrio sapi menggunakan RNA-Seq.*Genom BMC.***2010**,*11*, 711.[Referensi Silang]
179. Mamo, S.; Mehta, JP; McGettigan, P.; Adil, T.; Spencer, TE; Bazer, FW; Lonergan, P. Pengurutan RNA Mengungkapkan Kelompok Gen Baru dalam Konsep Sapi Sapi yang Terkait dengan Pengakuan Ibu atas Kehamilan dan Implantasi.*biologi. mereproduksi.***2011**,*85*, 1143–1151. [Referensi Silang]
180. Graf, A.; Krebs, S.; Zakhartchenko, V.; Schwalb, B.; Blum, H.; Wolf, E. Pemetaan halus aktivasi genom pada embrio sapi dengan sekuensing RNA.*Proses. Natal. Akademik. Sains. Amerika Serikat***2014**,*111*, 4139–4144. [Referensi Silang]
181. Chitwood, JL; Rincon, G.; Kaiser, GG; Medrano, JF; Ross, analisis PJ RNA-seq blastokista sapi tunggal.*Genom BMC.***2013**, *14*, 350.[Referensi Silang] [PubMed]
182. Luo, L.; Shi, Y.; Wang, H.; Wang, Z.; Dang, Y.; Li, S.; Wang, S.; Zhang, K. Penyuntingan dasar pada embrio sapi mengungkapkan peran spesifik spesies SOX2 dalam regulasi pluripotensi.*Genet PLoS.***2022**,*18*, e1010307. [Referensi Silang] [PubMed]
183. Zolini, AM; Blokir, J.; Rabaglino, MB; Rincon, G.; Hoelker, M.; Bromfield, JJ; Salilew-Wondim, D.; Hansen, PJ Gen yang terkait dengan kelangsungan hidup blastokista sapi betina yang diproduksi secara in vivo.*Res Jaringan Sel.***2020**,*382*, 665–678. [Referensi Silang]
184. Zolini, AM; Blokir, J.; Rabaglino, MB; TrSayabulo, P.; Hoelker, M.; Rincon, G.; Bromfield, JJ; Hansen, PJ Sidik jari molekuler embrio sapi betina yang diproduksi secara in vitro dengan kompetensi tinggi untuk membentuk dan mempertahankan kebuntingan†.*biologi. mereproduksi.***2019**,*102*, 292–305. [Referensi Silang]
185.NHaimm, M.; Ivask, M.; Parn, P.; Reimann, E.; KHaiks, S.; Jaakma, Ü. Mendeteksi Potensi Perkembangan Embrio dengan Single Blastomere RNA-Seq.*Gen***2023**,*14*, 569.[Referensi Silang] [PubMed]
186. Lavagi, I.; Krebs, S.; Simmet, K.; Beck, A.; Zakhartchenko, V.; Serigala, E.; Blum, H. Urutan RNA sel tunggal mengungkapkan heterogenitas perkembangan blastomer selama aktivasi genom utama pada embrio sapi.*Sains. Reputasi.***2018**,*8*, 4071.[Referensi Silang] [PubMed]
187. Kropp, J.; Khatib, H. Karakterisasi microRNA pada media kultur sapi in vitro berhubungan dengan kualitas dan perkembangan embrio.*J. Ilmu Susu.***2015**,*98*, 6552–6563. [Referensi Silang]
188. Simmet, K.; Kurome, M.; Zakhartchenko, V.; Reichenbach, H.-D.; Pegas, C.; Bahr, A.; Blum, H.; Philippou-Massier, J.; Wolf, E. Diferensiasi garis keturunan kedua dari embrio sapi gagal karena tidak adanya OCT4/POU5F.*bioRxiv***2021**. [Referensi Silang]

189. Zhao, X.-M.; Cui, L.-S.; Hao, H.-S.; Wang, H.-Y.; Zhao, S.-J.; Du, W.-H.; Wang, D.; Liu, Y.; Zhu, H.-B. Analisis transkriptome massa sel bagian dalam dan sel trofektoderm diisolasi dengan penyortiran sel yang diaktifkan secara magnetis dari blastokista sapi menggunakan sel tunggal RNA-seq. mereproduksi. *Domestik. animasi.***2016**,*51*, 726–735. [Referensi Silang]

190. Kropp, J.; Carillo, JA; Nama, H.; Daniels, A.; Salih, SM; Lagu, J.; Khatib, H. Status kesuburan pria dikaitkan dengan tanda metilasi DNA dalam sperma dan profil transkriptomik embrio praimplantasi sapi.*Genom BMC.***2017**,*18*, 280.[Referensi Silang]

191. Gilchrist, GC; Tscherner, A.; Nalpathamkalam, T.; Merico, D.; LaMarre, J. Ekspresi MicroRNA selama Pematangan dan Pemupukan Oosit Sapi.*Int. J.Mol. Sains.***2016**,*17*, 396.[Referensi Silang]

192. PerSayabulo, P.; Rabaglino, MB; Bom; Carvalheira, LDR; Uskup, JV; Hansen, TR; Hansen, PJ Dickkopf-related protein 1 adalah progestomedin yang bekerja pada embrio sapi selama transisi morula-ke-blastokista untuk memprogram pemanjangan trofoblas.*Sains. Reputasi.***2019**,*9*, 11816.[Referensi Silang]

193. Diaz-Lundahl, S.; Sundaram, AY; Gillund, P.; Gilfillan, GD; Olsaker, saya.; Krogenæs, A. Ekspresi Gen dalam Embrio Dari Red Bull Norwegia Dengan Tingkat Non-Pengembalian Tinggi atau Rendah: Studi RNA-Seq pada Embrio Tunggal yang Diproduksi secara in vivo.*Depan. Genet.* **2022**,*12*, 780113.[Referensi Silang] [PubMed]

194. Halstead, MM; Bu, X.; Zhou, C.; Schultz, RM; Ross, PJ Renovasi kromatin pada embrio sapi menunjukkan regulasi aktivasi genom spesifik spesies.*Nat. Komunitas.***2020**,*11*, 4654.[Referensi Silang] [PubMed]

195. Kotor, N.; Strillacci, MG; Peñagaricano, F.; Khatib, H. Karakterisasi dan peran fungsional RNA ayah dalam embrio sapi 2-4 sel.*Sains. Reputasi.***2019**,*9*, 20347.[Referensi Silang] [PubMed]

196. Shi, Y.; Zhao, P.; Dang, Y.; Li, S.; Luo, L.; Hu, B.; Wang, S.; Wang, H.; Zhang, K. Peran fungsional remodeler kromatin SMARCA5 pada embrio praimplantasi tikus dan sapi†.*biologi. mereproduksi.***2021**,*105*, 359–370. [Referensi Silang]

197. Li, S.; Shi, Y.; Dang, Y.; Luo, L.; Hu, B.; Wang, S.; Wang, H.; Zhang, K. Jalur pensinyalan NOTCH diperlukan untuk perkembangan embrio awal sapi. *biologi. mereproduksi.***2021**,*105*, 332–344. [Referensi Silang]

198. Zhu, L.; Zhou, T.; Iyyappan, R.; Ming, H.; Dvoran, M.; Wang, Y.; Chen, Q.; Roberts, RM; Susor, A.; Jiang, Z. Profil ribosom resolusi tinggi mengungkapkan selektivitas translasi untuk transkrip dalam pengembangan embrio praimplantasi sapi.*Perkembangan* **2022**,*149*, dev.200819. [Referensi Silang]

199. Kajdasz, A.; Warzych, E.; Derebecka, N.; Madeja, ZE; Lechniak, D.; Wesoly, J.; Pawlak, P. Penyimpanan Lipid dan Ekspresi Gen Terkait Metabolisme Lipid pada Embrio Partenogenetik Babi dan Sapi Diungkap dengan Pewarnaan Fluoresen dan RNA-seq.*Int. J.Mol. Sains.* **2020**,*21*, 6488.[Referensi Silang]

200. Nix, JL; Schettini, dokter umum; Biase, FH Sexing embrio sapi menggunakan data sekuensing RNA atau reaksi berantai polimerase berdasarkan rangkaian lengkap kromosom Y sapi.*Depan. Genet.***2023**,*14*, 569.[Referensi Silang]

201. Jiang, Z.; Matahari, J.; Dong, H.; Luo, O.; Zheng, X.; Obergfell, C.; Tang, Y.; Dua, J.; O'neill, R.; Ruan, Y.; dkk. Profil transkripsi pengembangan pra-implantasi sapi in vivo.*Genom BMC.***2014**,*15*, 756.[Referensi Silang]

202. Jiang, Z.; Dong, H.; Zheng, X.; Marjani, SL; Donovan, DM; Chen, J.; Tian, X. mRNA Tingkat Gen yang Tercetak pada Sapi Di Vivo Perbandingan Oosit, Embrio, dan Spesies Silang dengan Manusia, Tikus, dan Babi.*Sains. Reputasi.***2015**,*5*, 17898.[Referensi Silang] [PubMed]

203. Banliat, C.; Mahya,C.; Lavigne, R.; Datang.; Pineau, C.; Labas, V.; Guyonnet, B.; Mermillod, P.; Saint-Dizier, M. Perubahan dinamis pada proteom embrio sapi awal yang dikembangkan in vivo.*Depan. Pengembang Sel. biologi.***2022**,*10*, 863700.[Referensi Silang]

204. Tuntutan, M.; Jerman, DR; Fröhlich, T.; Serigala, E.; Arnold, GJ Analisis Proteome spesifikasi garis keturunan awal pada embrio sapi. *Proteomik* **2014**,*15*, 688–701. [Referensi Silang] [PubMed]

205. Jerman, DR; Fröhlich, T.; Otte, KA; Beck, A.; Habermann, FA; Serigala, E.; Arnold, Tanda Tangan Proteom Khusus Tahap GJ dalam Perkembangan Embrio Sapi Awal.*J. Proteom Res.***2014**,*13*, 4363–4376. [Referensi Silang]

206. Banliat, C.; Mahya,C.; Lavigne, R.; Datang.; Pineau, C.; Labas, V.; Guyonnet, B.; Mermillod, P.; Saint-Dizier, M. Analisis proteomik embrio sapi yang dikembangkan secara in vivo atau in vitro mengungkapkan kontribusi lingkungan ibu terhadap embrio awal. *Genom BMC.* **2022**,*23*, 839.[Referensi Silang]

207. Jensen, PL; Grøndahl, ML; Beck, HC; Petersen, J.; Stroebech, L.; Christensen, ST; Andersen, CY Analisis protein cairan blastocoel sapi dan sel blastokista.*sistem. biologi. mereproduksi. medis.***2014**,*60*, 127–135. [Referensi Silang]

208. Jensen, PL; Beck, HC; Petersen, TS; Stroebech, L.; Schmidt, M.; Rasmussen, LM; Hyttel, P. Analisis protein cairan dan sel kantung kuning telur sapi awal dari embrio praimplantasi berbentuk bulat telur dan memanjang hari ke-13.*Teriogenologi***2014**,*82*, 657–667. [Referensi Silang] [PubMed]

209. Talbot, NC; Powell, SAYA; Kaperna, TJ; Garrett, WM Analisis protein protein seluler utama dari garis sel trofektoderm sapi yang berasal dari IVP, partenogenetik dan embrio transfer nuklir: Mengurangi ekspresi lampiran I dan II dalam garis sel yang diturunkan dari transfer nuklir.*animasi. mereproduksi. Sains.***2010**,*120*, 187–202. [Referensi Silang] [PubMed]

210. Raes, A.; Wydooghe, E.; Pavani, KC; Pascottini, OB; Van Steendam, K.; Dhaenens, M.; Boel, A.; Heras, S.; Heindryckx, B.; Peelman, L.; dkk. Cathepsin-L yang Disekresikan oleh Embrio Sapi Berkualitas Tinggi Memberikan Efek Embriotrofik Secara In Vitro.*Int. J.Mol. Sains.* **2023**,*24*, 6563.[Referensi Silang]

211. Nel-Themaat, L.; Nagy, Z. Tinjauan tentang janji dan jebakan metabolisme oosit dan embrio.*Plasenta***2011**,*32*, S257–S263. [Referensi Silang] [PubMed]

212. Rieger, D.; Guay, P. Pengukuran metabolisme substrat energi pada blastokista sapi individu.*Reproduksi***1988**,*83*, 585–591. [Referensi Silang] [PubMed]

213. Thompson, JG; McNaughton, C.; Gasparrini, B.; McGowan, LT; Tervit, HR Pengaruh inhibitor dan pemisah fosforilasi oksidatif selama pemadatan dan blastulasi embrio sapi yang dibiakkan secara in vitro.*J.Reproduksi. Subur.***2000**,*118*, 47–56. [Referensi Silang]
214. Leese, HJ Apa yang dibutuhkan embrio?*Bersenandung. Subur.***2003**,*6*, 180–185. [Referensi Silang] [PubMed]
215. Gardner, D.; Pawelczynski, M.; Trounson, A. Penyerapan dan pemanfaatan nutrisi dapat digunakan untuk memilih blastokista sapi hari ke 7 yang layak setelah kriopreservasi.*mol. mereproduksi. Dev.***1996**,*44*, 472–475. [Referensi Silang]
216. Partridge, R.; Leese, H. Konsumsi asam amino oleh embrio praimplantasi sapi.*mereproduksi. Subur. Dev.***1996**,*8*, 945–950. [Referensi Silang]
217. Lopes, A.; Madsen, S.; Ramsing, N.; Løvendahl, P.; Greve, T.; Callesen, H. Investigasi respirasi embrio sapi individu yang diproduksi in vivo dan in vitro dan korelasinya dengan viabilitas setelah transfer.*Bersenandung. mereproduksi.***2006**,*22*, 558–566. [Referensi Silang]
218. Lopes, AS; jalur, M.; Thompson, JG Konsumsi oksigen dan produksi ROS meningkat pada saat pembuahan dan pembelahan sel pada zigot sapi. *Bersenandung. mereproduksi.***2010**,*25*, 2762–2773. [Referensi Silang]
219. Obeidat, Y.; Catandi, G.; Karnaval, E.; Chicco, AJ; DeMann, A.; Bidang, S.; Chen, T. Sistem multi-sensor untuk mengukur metabolisme embrio sapi.*Biosen. Bioelektron.***2018**,*126*, 615–623. [Referensi Silang]
220.GHaimez, E.; Muñoz, M.; SimHai,C.; IbAñez, C.; Carrocera, S.; PasarSayan-GonzAlez, D.; Cifuentes, A. Metabolomik non-invasif untuk meningkatkan penentuan penanda jenis kelamin embrio dalam media kultur yang ditentukan secara kimia.*J. Kromatografi. A***2016**,*1474*, 138–144. [Referensi Silang]
221.GHaimez, E.; Carrocera, S.; Martin, D.; Herrero, P.; Canela, N.; Muñoz, M. Pelepasan diferensial metabolit pemberi sinyal sel oleh embrio sapi jantan dan betina yang dikultur in vitro.*Teriogenologi***2018**,*114*, 180–184. [Referensi Silang] [PubMed]
222. Muñoz, M.; Uyar, A.; Correia, E.; DSayaez, C.; Fernandez-Gonzalez, A.; Caamaño, JN; Trigal, B.; Carrocera, S.; Seli, E.; Gomez, E. Penilaian non-invasif terhadap jenis kelamin embrio pada sapi dengan sidik jari metabolik media kultur in vitro.*Metabolomik***2014**, *10*, 443–451. [Referensi Silang]
223. dos Santos,É.;da Silva Martinho, H.; Annes, K.; da Silva, T.; Soares, C.; Leite, RF; Milazzotto, evaluasi profil metabolik noninvasif berbasis M. Raman pada embrio sapi in vitro.*J. Biomed. Memilih.***2016**,*21*, 075002.[Referensi Silang] [PubMed]
224. Rubessa, M.; Ambrosi, A.; Gonzalez-Pena, D.; Polkoff, KM; Wheeler, MB Analisis resonansi magnetik nuklir non-invasif terhadap metabolit embrio pria dan wanita selama kultur embrio in vitro.*Metabolomik***2018**,*14*, 113.[Referensi Silang] [PubMed]
225. Perkel, KJ; Madan, P. Analisis media kultur bekas dari embrio sapi yang dikultur secara individual menunjukkan perbedaan metabolisme.*Zigot***2017**,*25*, 662–674. [Referensi Silang]
226. Sturmey, R.; Bermejo-Alvarez, P.; Gutierrez-Adan, A.; Rizos, D.; Leese, H.; Lonergan, P. Metabolisme asam amino blastokista sapi: Sebuah biomarker seks dan kelangsungan hidup.*mol. mereproduksi. Dev.***2010**,*77*, 285–296. [Referensi Silang]
227. Makan Siang, GJ; Rieger, D.; Betteridge, KJ; Yadav, BR; King, WA Metabolisme glukosa dan glutamin pada embrio sapi pra-attachment dalam kaitannya dengan jenis kelamin dan tahap perkembangan.*Reproduksi***1991**,*93*, 125–132. [Referensi Silang]
228. Rieger, D.; Loskutoff, N.; Betteridge, K. Perubahan terkait perkembangan dalam penyerapan dan metabolisme glukosa, glutamin dan piruvat oleh embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*mereproduksi. Subur. Dev.***1992**,*4*, 547–557. [Referensi Silang]
229. Donnay, saya.; Leese, H. Metabolisme embrio selama perluasan blastokista sapi.*mol. mereproduksi. Dev.***1999**,*53*, 171–178. [Referensi Silang]
230. Khurana, NK; Niemann, H. Metabolisme Energi pada Embrio Sapi Praimplantasi Berasal Secara In Vitro atau In Vivo.*biologi. mereproduksi.* **2000**,*62*, 847–856. [Referensi Silang]
231. Rubessa, M.; Ambrosi, A.; Gonzalez-Pena, D.; Polkoff, KM; Denmark, SE; Wheeler, MB Analisis non-invasif metabolit embrio sapi selama kultur embrio in vitro menggunakan resonansi magnetik nuklir.*TUJUAN Bioeng.***2016**,*3*, 538–551. [Referensi Silang]
232. Steeves, T.; Gardner, D. Efek Temporal dan Diferensial Asam Amino terhadap Perkembangan Embrio Sapi dalam Kultur.*biologi. mereproduksi.* **1999**,*61*, 731–740. [Referensi Silang]
233.NHaimm, M.; Porosk, R.; Parn, P.; Kilk, K.; Soomets, U.; KHaiks, S.; Jaakma, Ü. Kultur in vitro dan profil metabolik non-invasif dari embrio sapi tunggal.*mereproduksi. Subur. Dev.***2019**,*31*, 306.[Referensi Silang] [PubMed]
234. Ferguson, EM; Leese, HJ Peran potensial trigliserida sebagai sumber energi selama pematangan oosit sapi dan perkembangan awal embrio.*mol. mereproduksi. Dev.***2006**,*73*, 1195–1201. [Referensi Silang]
235. Sudano, MJ; Rascado, TD; Tata, A.; Belaz, KR; Santos, VG; Valente, RS; Mesquita, FS; Ferreira, CR; Arakamujo, JP; Eberlin, M N; dkk. Tanda tangan lipidome pada perkembangan awal embrio sapi.*Teriogenologi***2016**,*86*, 472–484.e1. [Referensi Silang] [PubMed]
236. Kurosawa, H.; Utsunomiya, H.; Shiga, N.; Takahashi, A.; Ihara, M.; Ishibashi, M.; Nishimoto, M.; Watanabe, Z.; Abe, H.; Kumagai, J.; dkk. Pengembangan perangkat baru yang dapat diterapkan secara klinis untuk evaluasi embrio yang mengukur konsumsi oksigen embrio. *Bersenandung. mereproduksi.***2016**,*31*, 2321–2330. [Referensi Silang] [PubMed]
237. Asampille, G.; Cheredath, A.; Yusuf, D.; Adiga, SK; Atreya, HS Kegunaan spektroskopi resonansi magnetik nuklir dalam reproduksi terbantu.*Buka Biol.***2020**,*10*, 200092.[Referensi Silang]
238. Sivelli, G.; Conley, GM; Herrera, C.; Marable, K.; Rodriguez, KJ; Bollwein, H.; Sudano, MJ; Brugger, J.; Simpson, AJ; Boero, G.; dkk. Spektroskopi NMR dari embrio tahap awal mamalia tunggal.*J.Mag. Alasan.***2022**,*335*, 107142.[Referensi Silang]
239. Pomar, FR; Teards, K.; Anak-anak, A.; Colenbrander, B.; Tharasanit, T.; Aguilar, B.; Roelen, B. Perbedaan kejadian apoptosis antara blastokista yang dihasilkan in vivo dan in vitro dari spesies hewan ternak: Sebuah studi perbandingan.*Teriogenologi***2005**, *63*, 2254–2268. [Referensi Silang]

240. Sagirkaya, H.; Misirlioglu, M.; Kaya, A.; Pertama, NL; Parrish, J.; Memili, E. Korelasi perkembangan dan molekuler embrio praimplantasi sapi.*Reproduksi***2006**,*131*, 895–904. [Referensi Silang]
241. Ramos-Ibeas, P.; Gimeno, saya.; BisaHain-BeltrAn, K.; Gutiyaiturrez-IklanAn, A.; Rizos, D.; GHaimez, E. Senescence dan Apoptosis selama Pengembangan Embrio in vitro dalam Model Sapi.*Depan. Pengembang Sel. biologi.***2020**,*8*, 619902.[Referensi Silang] [PubMed]
242. Wondim, DS; Fournier, E.; Hoelker, M.; Saeed-Zidane, M.; Tholen, E.; Loteng, C.; Neuhoff, C.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Cincin, F.; dkk. Pola Metilasi DNA Seluruh Genom Blastokista Sapi yang Dikembangkan Secara In Vivo dari Embrio Menyelesaikan Berbagai Tahap Perkembangan In Vitro.*PLoS SATU***2015**,*10*, e0140467. [Referensi Silang]
243. Dobbs, KB; Rodriguez, M.; Sudano, MJ; Ortega, MS; Hansen, PJ Dinamika metilasi DNA selama perkembangan awal embrio sapi praimplantasi.*PLoS SATU***2013**,*8*, e66230. [Referensi Silang] [PubMed]
244. Morin-Dorya,L.; pirang, P.; Vigneault, C.; Agung, F.; Labreque, R.; Sirard, M. Status metilasi DNA blastokista sapi diperoleh dari donor oosit peripubertal.*mol. mereproduksi. Dev.***2020**,*87*, 910–924. [Referensi Silang] [PubMed]
245. Laskowski, D.; Rendah hati, P.; Tuan, M.-A.; Sjunnesson, Y.; Jhamat, N.; Båge, R.; Andersson, G. Pola metilasi DNA blastokista sapi terkait dengan hiperinsulinemia in vitro.*mol. mereproduksi. Dev.***2018**,*85*, 599–611. [Referensi Silang]
246. Salilew-Wondim, D.; Saeed-Zidane, M.; Hoelker, M.; Gebremedhn, S.; Poirier, M.; Pandey, HO; Tholen, E.; Neuhoff, C.; Diadakan, E.; Besenfelder, U.; dkk. Pola metilasi DNA seluruh genom blastokista sapi yang berasal dari embrio in vivo yang dikultur in vitro sebelum, selama atau setelah aktivasi genom embrionik.*Genom BMC.***2018**,*19*, 424.[Referensi Silang]
247.Duan, JE; Jiang, ZC; Alqahtani, F.; Mandoiu, I.; Dong, H.; Zheng, X.; Marjani, SL; Chen, J.; Tian, XC Metilom Dinamika Gamet Sapi dan Embrio Awal in vivo.*Depan. Genet.***2019**,*10*, 512.[Referensi Silang]
248.Ming, H.; Matahari, J.; Pasquariello, R.; Gatenby, L.; Herrick, JR; Yuan, Y.; Pinto, CR; Bondioli, KR; Krisher, RL; Jiang, Z. Lanskap kromatin yang dapat diakses dalam oosit sapi dan embrio awal.*Epigenetika***2020**,*16*, 300–312. [Referensi Silang]
249. Kurosaka, S.; Eckardt, S.; McLaughlin, KJ Definisi Silsilah Berpotensi Majemuk dalam Embrio Sapi dengan Lokalisasi Transkrip Oct4. *biologi. mereproduksi.* **2004**,*71*, 1578–1582. [Referensi Silang]
250. Hyttel, P.; Viuff, D.; Laurincik, J.; Schmidt, M.; Thomsen, P.; Avery, B.; Callesen, H.; Rath, D.; Niemann, H.; Rosenkranz, H.; dkk. Risiko produksi embrio sapi dan babi secara in-vitro: Penyimpangan jumlah kromosom, aktivasi gen RNA ribosom dan fisiologi perinatal. *Bersenandung. mereproduksi.***2000**,*15*, 87–97. [Referensi Silang]
251. Demida-PeyrAs, s.; Dorado, J.; Hidalgo, M.; Anter, J.; De Luca, L.; Genero, UGD; Moreno-MillAn, M. Pengaruh kualitas oosit, waktu inkubasi dan lingkungan pematangan terhadap jumlah kelainan kromosom pada embrio sapi awal yang diturunkan dari IVF. *mereproduksi. Subur. Dev.***2013**,*25*, 1077–1084. [Referensi Silang]
252. Guilherme, VB; Ucapkan, M.; dos Santos, PH; Siniciato, DDS; Takahashi, MB; Rocha, JC; Nogueira, MFG Sumber Berbeda dari Gambar Digital Bovine Blastocyst Tidak Menghasilkan Klasifikasi yang Sama dengan Perangkat Lunak yang Telah Dilatih Sebelumnya Menggunakan Jaringan Syaraf Tiruan.*bioRxiv***2018**, 424028.[Referensi Silang]
253. Rocha, JC; Passalia, FJ; Matos, FD; Takahashi, MB; Siniciato, DDS; Maserati, anggota parlemen; Alves, MF; de Almeida, TG; Cardoso, BL; Basso, AC; dkk. Sebuah metode berdasarkan kecerdasan buatan untuk mengotomatisasi sepenuhnya evaluasi gambar blastokista sapi.*Sains. Reputasi.* **2017**,*7*, 7659.[Referensi Silang]
254. Melo, DH; Nascimento, MZ; Oliveira, DL; Neves, LA; Annes, K. Algoritma untuk segmentasi otomatis embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*J.Fisika. Konf. Ser.***2014**,*490*, 012125.[Referensi Silang]
255. Ciniciato, DDS; Takahashi, MB; Nogueira, MFG; Rocha, JC Potensi Penggunaan Smartphone sebagai Alat untuk Menangkap Gambar Digital Embrio dari Mikroskop Stereo dan Mengevaluasinya dengan Jaringan Syaraf Tiruan. Dalam Prosiding Konferensi Internasional Penelitian dan Aplikasi Interaksi Komputer-Manusia, Funchal, Portugal, 31 Oktober–2 November 2017; hal.185–189. [Referensi Silang]
256. Nogueira, MFG; Guilherme, VB; Ucapkan, M.; Dos Santos, PH; da Silva, DLB; Rocha, JC Penilaian Kualitas Gambar Digital Bovine Blastocyst Berbasis Kecerdasan Buatan: Pengambilan Langsung dengan Lensa Kamera Smartphone yang Disandingkan dan Lensa Mata Mikroskop Stereo.*Sensor***2018**,*18*, 4440.[Referensi Silang]
257. Pekerja, AM; Heaton, anggota parlemen; Ley, BLV; Webster, DA; Sherry, L.; Larson, S.; Kalbfleisch, TS; Harhay, dokter umum; Pekerja, EE; Carlson, DF; dkk. Anak sapi pertama yang mengalami pengeditan gen dan memiliki kerentanan yang lebih rendah terhadap patogen virus utama.*bioRxiv***2022**. [Referensi Silang] [PubMed]
258. Melisho, E.; Briones, MA; Velasquez, AE; Cabezas, J.; Castro, FO; Rodriguez-Alvarez, L. Vesikel ekstraseluler yang disekresikan selama blastulasi menunjukkan kelangsungan hidup embrio sapi.*Reproduksi***2019**,*158*, 477–492. [Referensi Silang] [PubMed]
259. Melisho, EA; VelAremas, AE; Nunez, MJ; Cabezas, JG; Cueto, JA; Fader, C.; Castro, FO; RodrSayaguez-Alvarez, L. Identifikasi dan karakteristik vesikel ekstraseluler dari blastokista sapi yang diproduksi secara in vitro.*PLoS SATU***2017**,*12*, e0178306. [Referensi Silang]
260. Saadeldin, IM; Kim, SJ; Bin Choi, Y.; Lee, BC Peningkatan perkembangan embrio kloning melalui kultur bersama dengan parthenotes: Kemungkinan peran eksosom/mikrovesikel untuk komunikasi parakrin embrio.*Sel. memprogram ulang.***2014**,*16*, 223–234. [Referensi Silang] [PubMed]
261. Rabaglino, MB; O'doherty, A.; Secher, JB-M.; Penyendiri, P.; Hyttel, P.; Adil, T.; Kadarmideen, HN Penerapan integrasi data multi-omics dan pendekatan pembelajaran mesin untuk mengidentifikasi perbedaan epigenetik dan transkriptomik antara embrio sapi yang dihasilkan secara in vitro dan in vivo.*PLoS SATU***2021**,*16*, e0252096. [Referensi Silang]
262. Milazzotto, MP; Noonan, MJ; Ferraz, Data RNAseq Penambangan MDAMM mengungkapkan profil metaboloepigenetik dinamis pada embrio pra-implantasi manusia, tikus, dan sapi.*iSains***2022**,*25*, 103904.[Referensi Silang] [PubMed]
263. Dochi, O. Pemindahan langsung embrio sapi beku-cair dan penerapannya dalam pengelolaan reproduksi sapi.*J.Reproduksi. Dev.* **2019**,*65*, 389–396. [Referensi Silang] [PubMed]

264. Banik, S.; Melanthota, SK; Arbaaz; Vaz, JM; Kadambalithaya, VM; Husain, I.; Dutta, S.; Mazumder, N. Tren terkini dalam deteksi berbasis ponsel pintar untuk aplikasi biomedis: Sebuah tinjauan.*Dubur. Bioanal. kimia.***2021**,*413*, 2389–2406. [Referensi Silang] [PubMed]

265. Freeman, K.; Makan Malam, J.; Chuchu, N.; Takwoingi, Y.; Bayliss, SE; Matin, RN; Jain, A.; Walter, FM; Williams, HC; Deeks, Aplikasi ponsel cerdas berbasis Algoritma JJ untuk menilai risiko kanker kulit pada orang dewasa: Tinjauan sistematis terhadap studi akurasi diagnostik.*BMJ* **2020**,*368*, m127. [Referensi Silang] [PubMed]
266. Patil, SK; Nair, Bpk; Manjunath, A.; Mujib, BRA Evaluasi dan perbandingan seluruh pencitraan slide berbasis smartphone dan fotomikrografi.*J.Fam. medis. Formal. peduli***2020**,*9*, 2319–2323. [Referensi Silang]
267. Russ, JC; Matey, JR; Mallinckrodt, AJ; McKay, S. Buku Pegangan Pemrosesan Gambar.*Hitung. Fis.***1994**,*8*, 177–178. [Referensi Silang]

Penafian/Catatan Penerbit: Pernyataan, pendapat dan data yang terkandung dalam semua publikasi adalah sepenuhnya milik masing-masing penulis dan kontributor dan bukan milik MDPI dan/atau editor. MDPI dan/atau editor melepaskan tanggung jawab atas kerugian apa pun pada orang atau properti akibat ide, metode, instruksi, atau produk apa pun yang dirujuk dalam konten.

J. Ilmu Susu. 106:4380–4396 https://doi.org/10.3168/jds.2022-22736

© 2023, Penulis. Diterbitkan oleh Elsevier Inc. dan Fass Inc. atas nama American Dairy Science Association®. Ini adalah artikel akses terbuka di bawah lisensi CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Perbandingan sapi yang berasal dari fertilisasi in vitro, transfer embrio ovulasi ganda, dan inseminasi buatan
untuk produksi susu dan sifat kesuburan

Simon La Fontaine,[1] Rémi Labrecque,[2] Patrick Pirang,[2] Roger I. Isyarat,[3] dan Marc-André Sirard[1]*
[1]Centre de recherche en reproduksi, développement et santé intergénérationnelle (CRDSI), Département des Sciences Animales, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec, QC G1K 7P4, Kanada
[2]SEMEX Boviteq, 3450 Rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Kanada
[3]Departemen Ilmu Hewan, McGill University, Montréal, QC H9X 3V9, Kanada

ABSTRAK

Penggunaan teknologi reproduksi berbantuan seperti fertilisasi in vitro (IVF) semakin meningkat, khususnya pada sapi perah. Pertanyaan mengenai konsekuensi di kemudian hari belum secara langsung dibahas dalam penelitian terhadap populasi hewan dalam jumlah besar. Studi pada hewan pengerat dan data awal dari manusia dan sapi menunjukkan bahwa manipulasi gamet dan embrio secara in vitro dapat mengakibatkan perubahan metabolisme, pertumbuhan, dan kesuburan dalam jangka panjang. Tujuan kami adalah untuk mendeskripsikan lebih baik dugaan konsekuensi ini pada populasi sapi perah yang dihasilkan melalui IVF di Québec (Kanada) dan membandingkannya dengan hewan yang dikandung melalui inseminasi buatan (AI) atau transfer embrio ovulasi ganda (MOET). Untuk melakukan hal ini, kami memanfaatkan database fenotipik yang besar (2,5 juta hewan dan 4,5 juta laktasi) dari catatan susu di Québec yang dikumpulkan oleh Lactanet (Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Kanada) dan mencakup tahun 2012 hingga 2019. Kami mengidentifikasi 304.163, 12,993, dan 732 sapi yang dikandung melalui AI, MOET, dan IVF, masing-masing, dengan total 317,888 hewan Holstein yang informasinya kami ambil untuk masing-masing 576,448, 24,192, dan 1,299 laktasi (total = 601,939). Hasil susu yang dikoreksi energi genetik (GECM) dan Indeks Kinerja Seumur Hidup (LPI) induk sapi digunakan untuk menormalkan potensi genetik pada seluruh hewan. Jika dibandingkan dengan populasi Holstein secara umum, kinerja sapi MOET dan IVF mengungguli sapi AI. Namun, ketika membandingkan sapi-sapi MOET dan IVF yang sama dengan hanya satu kawanan dan memperhitungkan GECM mereka yang lebih tinggi dalam model, kami tidak menemukan perbedaan statistik antara metode konsepsi untuk produksi susu pada 3 laktasi pertama. Kami juga menemukan bahwa tingkat peningkatan Indeks Kinerja Seumur Hidup populasi IVF selama periode 2012 hingga 2019 lebih kecil dari tingkat yang diamati. pada populasi AI. Analisis kesuburan menunjukkan bahwa sapi MOET dan IVF juga mempunyai skor 1 poin lebih rendah dibandingkan induknya pada indeks kesuburan anak perempuan dan memiliki interval yang lebih lama dari layanan pertama hingga pembuahan, dengan rata-rata 35,52 hari dibandingkan dengan 32,45 untuk MOET dan 31,87 untuk hewan AI. Hasil ini menyoroti tantangan perbaikan genetik elit sekaligus membuktikan kemajuan yang telah dicapai industri dalam meminimalkan gangguan epigenetik selama produksi embrio. Meskipun demikian, upaya tambahan diperlukan untuk memastikan bahwa hewan IVF dapat mempertahankan kinerja dan potensi kesuburannya.

Kata kunci: sapi, IVF, ART, fenotipe, epigenetik

PERKENALAN

Produksi embrio sapi secara in vitro telah memperoleh peran utama dalam perbaikan genetik susu dalam dekade terakhir (IETS, 2020), karena pengurangan interval generasi yang signifikan dan peningkatan tekanan selektif betina yang diperoleh dari konvergensi seleksi genom, stimulasi ovarium, USG. pengambilan sel telur transvaginal yang dipandu, pematangan in vitro, fertilisasi in vitro (**IVF**), dan kultur embrio in vitro hingga tahap blastokista. Teknologi reproduksi berbantuan ini (**SENI**) memungkinkan seekor sapi dara menghasilkan banyak keturunan hanya beberapa bulan setelah siklus estrus pertamanya. Transfer embrio ovulasi ganda (**MOET**) dapat dilakukan setiap 6 hingga 8 minggu. Di sisi lain, pengambilan sel telur dapat dilakukan dengan aman setiap 2 minggu, sehingga semakin meningkatkan jumlah embrio yang dihasilkan per donor oosit dalam program produksi in vitro (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006; Sirard et al., 2018).

Namun, perubahan epigenetik pada gamet, embrio, konseptus, dan bayi baru lahir yang terkait dengan perubahan kondisi perikonsepsi terkait ART telah didokumentasikan pada beberapa spesies mamalia. Pada manusia, penelitian tentang plasenta dan darah tali pusat menunjukkan disregulasi progresif pada metilasi DNA dan modifikasi histon seiring dengan semakin banyaknya intervensi kesuburan yang invasif.

Diterima 6 September 2022.
Diterima 19 Desember 2022.
* Penulis yang sesuai: marc-andre.sirard@fsaa.ulaval.ca

seperti produksi in vitro, dikombinasikan dengan injeksi sperma intracytoplasmic atau siklus freeze-thaw (Choux et al., 2018; Choufani et al., 2019; Chen et al., 2020; Caramaschi et al., 2021). Meskipun awalnya berfokus pada kelainan yang berkaitan dengan gen yang tercetak (Young et al., 2001; Farin et al., 2006; Grace dan Sinclair, 2009; Chen et al., 2013; Lafontaine et al., 2020), efek epigenetik molekuler dari manipulasi gamet dan embrio secara in vitro juga didokumentasikan dalam model sapi pada tingkat gamet dan embrio (diulas dalam Urrego et al., 2014; Wu dan Sirard, 2020).

Sebagian besar pada manusia dan tikus, beberapa penelitian telah melaporkan efek jangka panjang ART (Chen dan Heilbronn, 2017). Misalnya, anak-anak yang menjalani IVF menunjukkan tekanan darah sistolik dan diastolik yang lebih tinggi dibandingkan anak-anak yang dilahirkan secara alami (Ceelen et al., 2008; Valenzuela-Alcaraz et al., 2013; Zandstra et al., 2020), serta gangguan metabolisme glukosa (Ceelen dkk., 2008; Gkourogianni dkk., 2014). Namun, penting untuk disebutkan bahwa dampak ART tampaknya tidak sistematis melainkan terbatas pada populasi yang tidak ada (outlier), mengacu pada fakta bahwa sebagian besar individu atau hewan tidak terpengaruh oleh atau memberikan kompensasi terhadap kondisi perikonseptual yang merugikan (Choufani dkk. ., 2019). Hal ini diilustrasikan oleh beberapa penelitian kohort yang mencatat tidak adanya dampak kesehatan yang merugikan di kemudian hari (Halliday et al., 2019), atau efek sementara yang teratasi pada perkembangan awal pascakelahiran atau masa kanak-kanak (Novakovic et al., 2019). Perbedaan metilasi DNA darah juga dilaporkan menghilang saat dewasa (Penova-Veselinovic et al., 2021). Literatur yang tersedia mengenai efek jangka panjang ART pada sapi masih sangat sedikit mengingat tingginya fenotipe yang terjadi di industri susu. Memang benar, fenotip high-throughput yang konvensional dan baru telah menyebabkan akumulasi sejumlah besar data tentang individu hewan dan kelompok, dan munculnya "data besar" peternakan (Koltes et al., 2019; Cole et al., 2020), membuka pintu untuk studi kohort longitudinal retrospektif presisi tinggi. Contoh langka di tingkat kelompok termasuk Siqueira dkk. (2017, 2019), yang menganalisis catatan dari 1.252 anak sapi dan 831 sapi. Studi tersebut menyimpulkan bahwa anak sapi IVF memiliki bobot lahir lebih tinggi dan sapi yang berasal dari semen-IVF yang disortir terbalik memiliki produksi susu yang lebih rendah pada laktasi pertamanya. Temuan serupa menunjukkan bahwa anak sapi IVF lebih berat saat lahir dibandingkan anak sapi AI (Rérat dkk., 2005) dan transfer embrio (**DAN**) pedet lebih berat dibandingkan pedet AI (Wilson dkk., 1995) juga dilaporkan sebelumnya. Meskipun penelitian oleh Bonilla et al. (2014) tidak menemukan perbedaan berat badan lahir antara ET dan AI, serta Viziack (2020) dan Baruselli dkk. (2021) tidak menemukan perbedaan berat lahir dan produksi susu terkait dengan ART sebagaimana dicatat dalam Siqueira dkk. (2017), ET dan IVF pedet dari penerima nulipara memiliki berat badan lahir dan sapih yang lebih rendah serta produksi susu yang lebih rendah. Karena faktor penerima yang sama antara ET dan IVF, desain eksperimental yang membandingkan ET versus IVF versus AI dapat secara efektif menghilangkan variasi yang disebabkan oleh penerima dari kontras AI-IVF, sehingga memungkinkan karakterisasi hasil yang lebih spesifik terkait dengan manipulasi in vitro.

Untuk menjelaskan lebih jauh dampak jangka panjang ART pada sapi, kami mensurvei database Lactanet yang darinya kami memperoleh catatan beberapa ratus hewan IVF bersama dengan puluhan ribu hewan ET dan ratusan ribu hewan AI, masing-masing dengan EBV dan seterusnya yang terperinci. hingga 3 laktasi yang tercatat. Analisis kami berfokus pada produksi susu dan kinerja reproduksi pada tingkat populasi, oleh karena itu berbagai metode analisis digunakan untuk mengoreksi faktor manajemen dan lingkungan lainnya guna meningkatkan keterwakilan hasil.

BAHAN DAN METODE

Data

Tidak ada subjek manusia atau hewan yang digunakan, jadi analisis ini tidak memerlukan persetujuan dari Komite Perawatan dan Penggunaan Hewan Institusional atau Dewan Peninjau Institusional. Studi kohort retrospektif dilakukan dengan menggunakan kumpulan data DHI yang disediakan oleh Lactanet Inc. (Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Kanada), yang berisi informasi tentang kawanan sapi Holstein yang terdaftar di Québec dan memiliki setidaknya 1 kali laktasi antara tahun 2012 dan 2019 Data Lactanet disediakan dalam 2 file terpisah berikut: file hewani dan file laktasi. Dalam berkas hewan tersebut antara lain berisi nomor induk internal hewan, nomor registrasi buku kawanan hewan, serta nomor registrasi induk dan induk. File laktasi berisi produksi susu dan variabel terkait laktasi seperti nomor laktasi, tanggal mulai dan berakhir laktasi, serta total produksi susu, lemak, dan protein laktasi. Kumpulan data asli berisi 2.506.575 catatan hewan dan 4.096.899 catatan laktasi.

Atribusi metode konsepsi ART (IVF, MOET) dimungkinkan dengan menggunakan catatan dari Holstein Kanada (Brantford, ON, Kanada) dan menggabungkannya ke arsip hewan Lactanet dengan nomor registrasi hewan.

EBV juga disediakan oleh Lactanet. EBV sapi diekstraksi pada tanggal 3 Maret 2021, dan berisi 725.543 catatan, sedangkan EBV sapi diambil dari uji coba April 2021 (https://www.cdn.ca/files_ge_datafiles.php?year=2021&month=04) dan berisi 15.585 catatan.

Tabel 1. Hewan dan laktasi tersedia untuk model produksi

	Semua ternak				kawanan IVF			
	Hewan		Laktasi		Hewan		Laktasi	
Metode konsepsi[1]	N	%	N	%	N	%	N	%
AI	304.163	95,68	576.448	95,77	16.905	79.66	31.437	80.29
Transfer embrio (MOET)	12.993	4.09	24.192	4.02	3.585	16.89	6.418	16.39
IVF	732	0,23	1.299	0,22	732	3.45	1.299	3.32

[1]MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

Analisis mengenai produksi (ECM), potensi outlier genetik, kami menghilangkan laktasi dengan salah satu potensi tersebut (Indeks Kinerja Seumur Hidup, **LPI**), dan hasil susu, lemak, atau protein di atas persentil kesuburan ke-99 (kesuburan anak perempuan, **DF**) dilakukan pada 2 kumpulan data berbeda berdasarkan kelompok ternak yang dimasukkan. Kumpulan data "semua kelompok" berisi semua hewan atau laktasi tanpa memandang kelompok ternak yang disertakan, sedangkan kumpulan data "kelompok IVF" hanya mencakup hewan atau laktasi dari kelompok yang berisi setidaknya 1 hewan IVF setelah periode 2012 hingga 2019.

Pemrosesan data, visualisasi, dan analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SAS versi 9.4 (SAS Institute Inc.). Saat menguji model linier campuran, efek tetap ditambahkan ke model satu per satu dan diperiksa signifikansi statistiknya menggunakan uji jumlah kuadrat tipe III. Demikian pula, efek acak ditambahkan ke model satu per satu. Setelah efek acak baru ditambahkan ke model, nilai kriteria informasi Bayesian dibandingkan dengan model tanpa efek acak tersebut. Efek acak dinilai signifikan secara statistik jika penyertaannya menurunkan nilai kriteria informasi Bayesian sebesar 8 atau lebih.

Rata-rata kuadrat terkecil, batas kepercayaan, dan beberapa perbandingan dihitung menggunakan pernyataan LSMEANS. Kecuali dinyatakan sebaliknya, *P*-nilai untuk beberapa perbandingan dikoreksi menggunakan metode Bonferroni.

Produksi

Hewan (dari kumpulan data yang disebutkan di atas) dimasukkan dalam analisis jika hasil susu, lemak, dan protein, serta nilai perkembangbiakan induk dan indukan, tersedia. Untuk hewan-hewan ini, kami membatasi analisis kami pada 3 laktasi pertama karena semakin sedikitnya jumlah laktasi yang tersedia pada banyak hewan, khususnya hewan IVF (Gambar Tambahan S1; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). Untuk menghindari potensi dampak pemotongan, kami menghapus laktasi mulai tahun 2019, sehingga memberikan semua hewan kesempatan untuk mendapatkan laktasi lengkap. Selain itu, laktasi yang berlangsung kurang dari 180 hari dianggap tidak lengkap dan dihapus dari kumpulan data. Akhirnya, untuk menghindari

Hasil ECM untuk setiap laktasi dihitung sebagai berikut menggunakan persamaan 1 (Jamrozik et al., 2020):

$$\text{ECM (kg)} = 0{,}25 \times \text{susu (kg)} + 12{,}2 \times \text{lemak (kg)} + 7{,}7 \times \text{protein (kg)}. \quad [1]$$

Demikian pula dengan ECM genetik (**GECM**) EBV induk dan indukan dihitung sebagai berikut dengan menggunakan koefisien yang sama pada EBV hasil susu, lemak, dan protein (persamaan 2):

$$\text{GECM (kg)} = 0{,}25 \times \text{EBV susu (kg)} + 12{,}2 \times \text{EBV lemak (kg)} + 7{,}7 \times \text{protein EBV (kg)}. \quad [2]$$

Pengaruh masing-masing metode konsepsi terhadap hasil ECM laktasi dianalisis menggunakan prosedur campuran kinerja tinggi (HPMIXED) dari SAS versi 9.4 (SAS Institute Inc.). Untuk "semua kelompok" dan "kelompok IVF", kami menggunakan model berikut, seperti yang dijelaskan oleh persamaan 3:

$$Y_{tidak} = \mu + pembuahan_{Saya} + B_1\, tuanGECM_J + B_2\, bendunganGECM_k + lakNo_{aku} + pembuahan_{Saya} \times lakNo_{aku} + tahun\ laktat_M + HRD_N \times pembuahan_{Saya} + tahun\ laktat_M \times HRD_N + sapi_{saya\ tidak} + e_{tidak}, \quad [3]$$

Di mana Y_{tidak} adalah hasil ECM laktasi (kg); μ adalah efek rata-rata secara keseluruhan; $pembuahan_{Saya}$ adalah efek tetap dari *Saya* metode yang digunakan untuk mengandung hewan itu (*Saya*=AI, MOET, IVF); B_1 adalah koefisien regresi dari *Y* pada tuan GECM ($tuanGECM_J$); $tuanGECM_J$ adalah nilai tercatat dari *J* Baginda; B_2 adalah koefisien regresi dari *Y* di bendungan GECM ($bendunganGECM_k$); $bendunganGECM_k$ adalah nilai tercatat dari *k* bendungan; $lakNo_{aku}$ adalah pengaruh tetap dari angka laktasi (paritas) sapi (*aku*=1, 2, 3);

$pembuahan_{Saya} \times lakNo_{aku}$ adalah efek tetap dari interaksi *Saya* metode konsepsi dengan *aku* nomor laktasi; $tahun\ laktat_M$ adalah efek acak dari *M* kekurangan-tahun tahun (*M*=2012,. . .,2018), $tahun\ bertindak_M \sim N(0, \sigma^2_{tahun\ laktat})$; $HRD_N \times pembuahan_{Saya}$ adalah interaksi acak dari *N* kawanan dengan *Saya* metode konsepsi, $rd_N \times pembuahan_{Saya} \sim N(0, \sigma^2_{HRD \times pembuahan})$; $tahun\ laktat_M \times HRD_N$ adalah interaksi acak dari *M* tahun laktasi dengan *N* kawanan, $tahun\ bertindak_M \times HRD_N \sim N(0, \sigma^2_{tahun\ laktat \times HRD})$; $sapi_{saya\ tidak}$ adalah efek acak dari *Hai* sapi dari *Saya* konsepsi tentang *N* kawanan, $aduh_{saya\ tidak} \sim N(0, \sigma^2_{sapi})$; e_{tidak} adalah sisa acak, $_{tidak} \sim N(0, \sigma^2_{e})$.

Indeks Kinerja Seumur Hidup

Kami menggunakan LPI (CDN, 2022) untuk membandingkan potensi genetik anak perempuan dengan potensi genetik orang tuanya. Meskipun perbandingan atau konversi langsung dengan indeks seleksi Kanada atau internasional lainnya tidak mungkin dilakukan, komposisinya memberikan informasi kepada kita tentang filosofi pemuliaan yang mendasarinya. Mulai April 2022, LPI Holstein memberikan bobot 40% pada sifat produksi, 40% pada sifat daya tahan, dan 20% pada sifat kesehatan dan kesuburan. Sebagai perbandingan, Indeks Kinerja Total Amerika memberikan bobot sebesar 46% pada produksi, 26% pada konformasi, dan 28% pada kesehatan dan kesuburan (https://www.holsteinusa.com/genetic_evaluations/ss_tpi_formula.html).

Kami hanya mengandalkan hewan (anak perempuan) dengan evaluasi genetik lengkap dan data induk juga tersedia. Hal ini membatasi jumlah hewan seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2. Kami menganalisis perbedaan antara LPI anak perempuan dan rata-rata induknya (**PA**) LPI (*LPI_Perbedaan*; persamaan 4) sebagai berikut:

$$PI_Perbedaan = PutriLPI - \frac{tuanLPI + bendunganLPI}{2}. \quad [4]$$

Dampak setiap metode konsepsi terhadap perbedaan LPI antargenerasi dianalisis menggunakan prosedur campuran (MIXED) SAS versi 9.4. Untuk "semua kelompok" dan "kelompok IVF" kami menggunakan model berikut, seperti yang dijelaskan oleh persamaan 5:

$$Y_{ijkl} = \mu + pembuahan_{Saya} + b_1\ tanggal\ lahir_j + B_2 PALPI_k + HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya} + e_{ijkl}, \quad [5]$$

Di mana Y_{ijkl} apakah perbedaan LPI; μ adalah efek rata-rata secara keseluruhan; $pembuahan_{Saya}$ adalah efek tetap dari *Saya* metode yang digunakan untuk mengandung anak perempuan itu (*Saya*=AI, MOET, IVF); B_1 adalah koefisien regresi dari *Y* pada putrinya tanggal lahir (*tanggal lahir*$_j$); *tanggal lahir*$_j$ adalah tanggal lahir yang tercatat *j* putri ke; B_2 adalah koefisien regresi dari *Y* pada PA LPI ($PALPI_k$); $PALPI_k$ adalah nilai terukur dari *k* orang tua; $HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya}$ adalah interaksi acak dari *aku* kawanan dengan *Saya* konsepsi metode, $rd_{aku} \times pembuahan_{Saya} \sim N(0, \sigma^2_{HRD \times pembuahan})$; e_{ijkl} adalah sisa acak, $_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2_{e})$.

Perkiraan rata-rata LPI tahunan dengan metode konsepsi dihitung menggunakan pernyataan ESTIMATE.

Meja 2. Hewan tersedia untuk model Indeks Performa Seumur Hidup

	Semua ternak		kawanan IVF	
Metode konsepsi[1]	N	%	N	%
AI	373.528	95.45	29.098	81,90
Transfer embrio (MOET)	16.926	4.33	5.549	15.62
IVF	882	0,23	882	2.48

[1]MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

Kesuburan Putri

Analisis serupa dengan LPI dilakukan pada subindeks DF. Indeks ini terdiri dari beberapa sifat, semuanya bertujuan untuk meminimalkan waktu yang dibutuhkan sapi dara atau sapi untuk mencapai tonggak siklus reproduksi. Detail komposisi dan bobot masing-masing sifat dapat dilihat pada Tabel 3.

Sekali lagi, hewan yang dimasukkan untuk analisis memiliki nilai rata-rata DF langsung dan induk (Tabel 4). Perbedaan DF antara anak perempuan dan orang tuanya (*DF_Perbedaan*) dihitung dengan mengurangkan mean aritmatika nilai DF orang tua dengan nilai DF anak perempuan itu sendiri (persamaan 6) sebagai berikut:

$$F_Perbedaan = PutriDF - \frac{tuanDF + sialan}{2}. \quad [6]$$

Dampak setiap metode konsepsi terhadap perbedaan DF antargenerasi dianalisis menggunakan prosedur campuran (MIXED) SAS versi 9.4. Untuk keduanya semua

Tabel 3. Komposisi indeks kesuburan anak perempuan

Sifat	Berat (%)
Usia saat pelayanan pertama untuk sapi dara Tingkat	11
tidak kembali ke 56 hari untuk sapi dara Pelayanan	16
pertama hingga pembuahan untuk sapi dara Interval	8
dari beranak hingga layanan pertama Tingkat tidak	15
kembali hingga 56 hari untuk sapi Pelayanan pertama	34
hingga pembuahan untuk sapi	16

Tabel 4. Hewan tersedia untuk model kesuburan anak perempuan

	Semua ternak		kawanan IVF	
Metode konsepsi[1]	N	%	N	%
AI	364.670	95,60	26.555	82.31
Transfer embrio (MOET)	16.070	4.21	4.981	15.44
IVF	728	0,19	728	2.26

[1]MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

kelompok dan kelompok IVF, kami menggunakan model berikut, seperti yang dijelaskan oleh persamaan 7:

$$Y_{ijkl} = \mu + pembuahan_{Saya} + B_1\, tanggal\ lahir_j + B_2 PADF_k + HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya} + e_{ijkl}, \quad [7]$$

Di mana Y_{ijkl} apakah perbedaan DF; μ adalah efek rata-rata secara keseluruhan; $pembuahan_{Saya}$ adalah efek tetap dari *Saya* metode yang digunakan untuk mengandung hewan itu (*Saya*=AI, MOET, IVF); B_1 adalah koefisien regresi dari Y pada tanggal lahir putri (*tanggal lahir*$_j$); *tanggal lahir*$_j$ adalah tanggal lahir yang tercatat j putri ke; B_2 adalah koefisien regresi dari Y pada PA DF ($PADF_k$); $PADF_k$ adalah nilai terukur dari k orang tua; $HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya}$ adalah interaksi acak dari *aku* kawanan dengan *Saya* metode konsepsi, $rd_N \times pembuahan_{Saya} \sim N(0, \sigma^2_{HRD \times pembuahan})$; e_{ijkl} adalah acak sisa, $_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2_{e})$.

Interval dari Servis Pertama hingga Konsepsi

Kami mengamati interval dari servis pertama hingga pembuahan sehubungan dengan metode yang digunakan untuk mengandung sapi. Dibandingkan dengan metrik interval reproduksi lainnya (hari terbuka, interval beranak, dan sebagainya), interval ini memiliki keuntungan karena tidak termasuk bias terkait manajemen seperti masa tunggu sukarela setelah melahirkan, sehingga memungkinkan kita untuk lebih memahami alasan biologis terhadap kinerja reproduksi.

Jumlah siklus reproduksi dengan informasi yang tersedia untuk variabel ini ditunjukkan pada Tabel 5. Karena banyaknya nilai "0" (konsepsi terjadi pada layanan pertama) dan bias positif dari distribusi Namun, kami mengandalkan uji nonparametrik Kruskal-Wallis dan metode Dwass, Steel, Critchlow-Flinger untuk perbandingan berpasangan yang termasuk dalam prosedur SAS NPAR1WAY.

Usia pada Layanan Pertama

Usia pertama kali melakukan servis merupakan sifat yang termasuk dalam subindeks DF (Tabel 3). Jumlah hewan dengan informasi yang tersedia dapat dilihat pada Tabel 6.

Pengaruh masing-masing metode konsepsi terhadap usia antargenerasi saat pertama kali melakukan pelayanan dianalisis menggunakan prosedur campuran (MIXED) dari SAS versi 9.4. Untuk kumpulan data "semua kelompok" dan "kelompok IVF", kami menggunakan model berikut, seperti yang dijelaskan oleh persamaan 8:

$$Y_{ijkl} = \mu + pembuahan_{Saya} + B_1\, tanggal\ lahir_j + B_2 PADF_k + HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya} + e_{ijkl}, \quad [8]$$

Di mana Y_{ijkl} adalah umur pertama kali melakukan servis; μ adalah efek rata-rata secara keseluruhan; $pembuahan_{Saya}$ adalah efek tetap dari *Saya* metode yang digunakan untuk mengandung hewan itu (*Saya*=AI, MOET, IVF); B_1 adalah koefisien regresi dari Y pada tanggal lahir putri (*tanggal lahir*$_j$); *tanggal lahir*$_j$ adalah tanggal lahir yang tercatat j putri ke; B_2 adalah koefisien regresi dari Y pada PA DF ($PADF_k$); $PADF_k$ adalah nilai terukur dari k orang tua; $HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya}$ adalah interaksi acak dari *aku* kawanan dengan *Saya* metode konsepsi, $HRD_N \times pembuahan_{Saya}$ $N(0, \sigma^2_{HRD \times pembuahan})$; e_{ijkl} adalah sisa acak, $_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2_{e})$.

Tabel 5. Interval dari servis pertama hingga pembuahan

	Semua ternak			kawanan IVF		
Metode konsepsi[1]	N	Berarti (hari)	SD	N	Saya dan)	SD
AI	850.884	32.45[A]	45.05	51.052	31.89[A]	44.76
Transfer embrio (MOET)	32.271	31.87[A]	44.45	8.390	31.08[A]	44.33
IVF	1.014	35.52[B]	46.06	1.014	35.52[B]	46.06

[a,b]Berarti dengan superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda dengan P<0,01 (a ≠ b).
[1]MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

Tabel 6. Usia saat servis pertama

	Semua ternak			kawanan IVF		
Metode konsepsi[1]	N	LSM (d)	SE	N	LSM (d)	SE
AI	283.738	469.51[B]	0,5183	13.805	460.52[A]	2.3480
Transfer embrio (MOET)	11.011	462.74[A]	1.0329	2.489	457.71[A]	2.6475
IVF	324	459.58[A]	3.7457	324	457.32[A]	3.4755

[a,b]Berarti dengan superskrip yang berbeda pada kolom yang sama berbeda dengan $P<0,05$ (a ≠ b).
[1]MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

Interval Berkembang Biak (Kematian Embrionik)

Waktu antara layanan berturut-turut dalam siklus reproduksi dihitung dengan tujuan menyimpulkan penyebab kegagalan reproduksi berdasarkan penundaan sebelum estrus dan layanan berikutnya (Tambahan Gambar S2; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). Interval pembiakan kurang dari 3 hari dikaitkan dengan keamanan pembiakan dan dikeluarkan dari analisis. Interval untuk analisis ditunjukkan pada Tabel 7.

Meskipun ini bukan satu-satunya penyebab tertundanya perkembangbiakan, jasa yang terjadi setelah lebih dari 30 hari (interval perkawinan > 30 hari) diklasifikasikan memiliki kemungkinan lebih tinggi sebagai akibat dari kematian embrio. Hasil biner ini dianalisis menggunakan model campuran linier umum dengan prosedur GLIMMIX di SAS 9.4

Untuk kumpulan data "semua kelompok", kami menggunakan model berikut, seperti yang dijelaskan oleh persamaan 9:

$$Y_{ijklmn} = \mu + pembuahan_{Saya} + B_1 PADF_j + keseimbangan_k + pembuahan_{Saya} \times keseimbangan_k + HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya} + tahun\ pelayanan_M + sapi_{iln} + e_{ijklmn}, \quad [9]$$

Di mana Y_{ijklmn} merupakan penyebab kegagalan reproduksi (0 = lainnya, 1 = kematian embrio); μ adalah efek rata-rata secara keseluruhan; $pembuahan_{Saya}$ adalah efek tetap dari *Saya* metode yang digunakan untuk mengandung sapi itu (*Saya*=AI, MOET, IVF); B_1 adalah koefisien regresi dari Y pada PA DF ($PADF_j$); $PADF_j$ adalah nilai terukur dari j orang tua; $keseimbangan_k$ adalah efek tetap dari paritas sapi (k=0, 1, 2, 3); $pembuahan_{Saya} \times keseimbangan_k$ adalah efek tetap dari interaksi *Saya* metode konsepsi dengan k paritas; $HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya}$ adalah interaksi acak dari *aku* kawanan dengan *Saya* metode konsepsi, $rd_{aku} \times pembuahan_{Saya} \sim N(0, \sigma^2_{HRD \times pembuahan})$; $tahun\ pelayanan_M$ adalah efek acak dari M tahun dinas (M=2012, . . . , 2018), $tahun\ layanan_M \sim N(0, \sigma^2_{tahun\ pelayanan})$; $sapi_{iln}$ adalah efek acak dari N sapi dari *Saya* konsepsi tentang itu *aku* kawanan, $aduh_{iln} \sim N(0, \sigma^2_{sapi})$; e_{ijklmn} adalah pengulangan acak samping $e_{ijklmn} \sim Tempat\ sampah(N, P)$.

Untuk kumpulan data "kelompok IVF", kami menggunakan model berikut, seperti yang dijelaskan oleh persamaan 10:

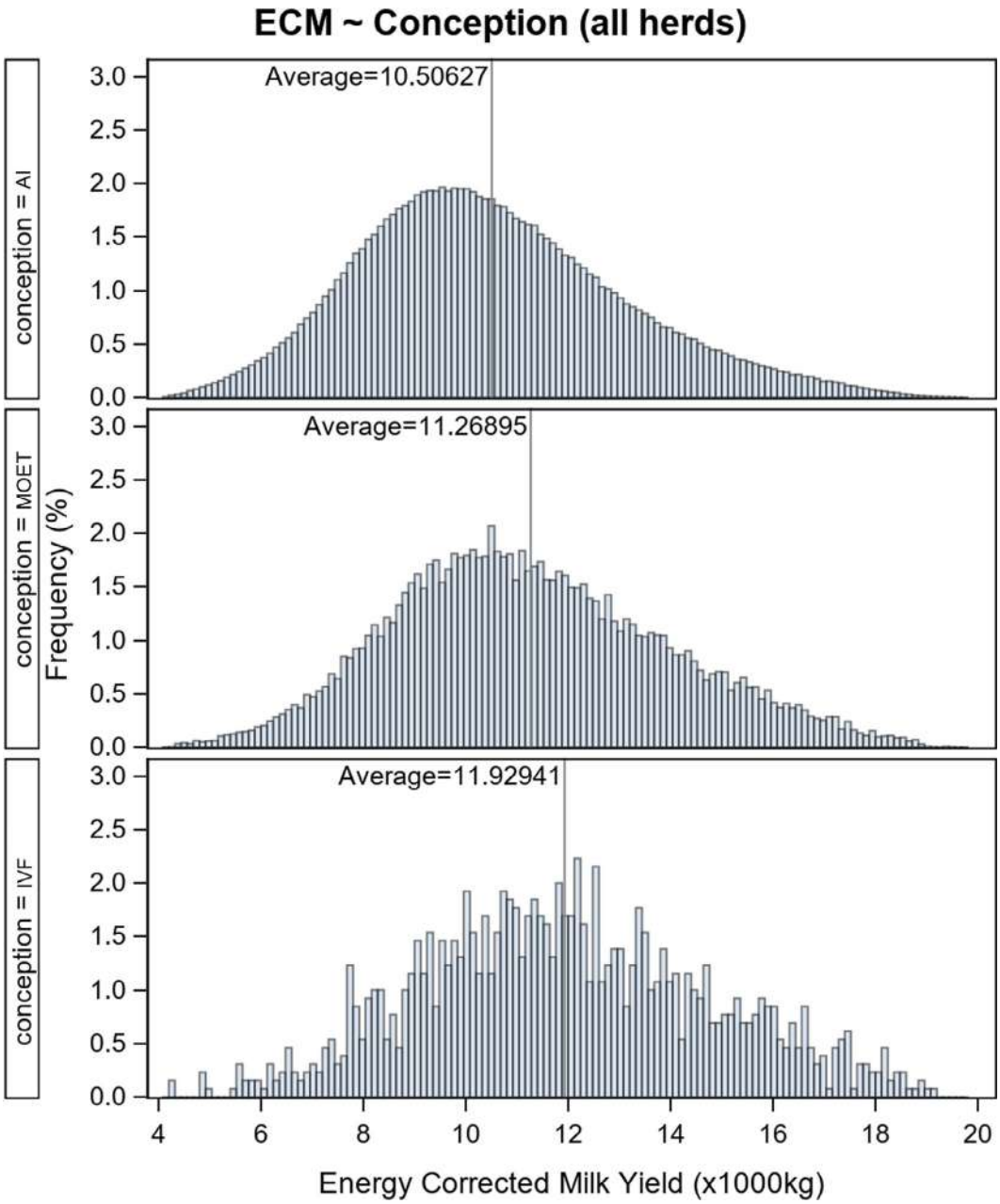
$$Y_{ijklmn} = + pembuahan_{Saya} + B_1 PADF_j + keseimbangan_k + pembuahan_{Saya} \times keseimbangan_k + HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya} + sapi_{film} + e_{ijklm}, \quad [10]$$

Di mana Y_{ijklmn} merupakan penyebab kegagalan reproduksi (0 = lainnya, 1 = kematian embrio); μ adalah efek rata-rata secara keseluruhan; $pembuahan_{Saya}$ adalah efek tetap dari *Saya* metode yang digunakan untuk mengandung sapi itu (*Saya*=AI, MOET, IVF); B_1 adalah koefisien regresi dari Y pada PA DF ($PADF_j$); $PADF_j$ adalah nilai terukur dari j orang tua; $keseimbangan_k$ adalah efek tetap dari paritas sapi (k=0, 1, 2, 3); $pembuahan_{Saya} \times keseimbangan_k$ adalah efek tetap dari interaksi *Saya* metode konsepsi dengan k paritas; $HRD_{aku} \times pembuahan_{Saya}$ adalah interaksi acak dari *aku* kawanan dengan *Saya* metode konsepsi, $rd_{aku} \times pembuahan_{Saya} \sim N(0, \sigma^2_{HRD \times pembuahan})$; $sapi_{film}$ adalah lari-efek dom dari M sapi dari *Saya* konsepsi tentang

Tabel 7. Data tersedia untuk model interval pemuliaan (kematian embrio).

	Semua ternak				kawanan IVF			
Metode konsepsi[1]	Hewan (n)	Perkembangbiakan (total)	Pembiakan (interval perkembangbiakan > 30 hari)	% dari >30-hari pembiakan selang	Hewan (n)	Perkembangbiakan (total)	Pembiakan (interval perkembangbiakan > 30 hari)	% dari >30-hari pembiakan selang
AI	249.970	966.891	571.146	59.07	13.831	52.260	31.480	60.24
Transfer embrio (MOET)	10.400	41.677	24.506	58.80	2.753	10.781	6.356	58.96
IVF	482	2.061	1.264	61.33	482	2.061	1.264	61.33

[1]MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.



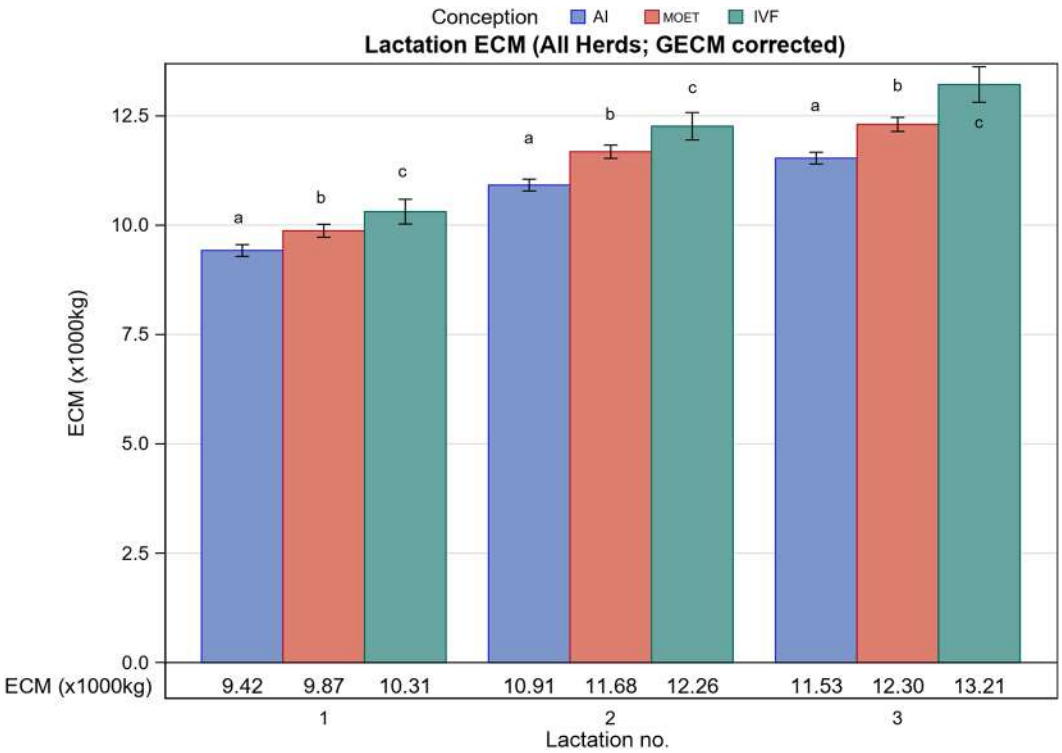
Gambar 1. Distribusi hasil ECM laktasi di seluruh metode konsepsi untuk sapi di semua kelompok. Konsepsi adalah cara dimana sapi dikandung. MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

itu aku kawanan, $aduh_{film} \sim N(0, \sigma^2_{sapi})$; e_{ijklm} adalah pengulangan acak samping, $e_{ijklm} \sim Tempat\ sampah(N, P)$.

HASIL

Produksi

Distribusi ECM dan LPI. Kami pertama-tama mengeksplorasi data dengan mengamati distribusi hasil utama, termasuk produksi ECM dan LPI. Kami mengamati perbedaan visual dalam distribusi ECM antara metode konsepsi (Gambar 1; Gambar Tambahan S3; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). Perbedaan-perbedaan ini signifikan pada kumpulan data "semua kelompok" (Gambar 2), dibandingkan dengan "kelompok IVF", yang perbedaannya berada pada arah yang sama namun tidak signifikan (Gambar Tambahan S4; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022).



Gambar 2. Metode konsepsi × paritas (nomor laktasi) interaksi LSM. Hasil ECM laktasi di seluruh metode konsepsi dan paritas (jumlah laktasi) untuk sapi di semua kelompok. Model statistik yang digunakan juga mencakup efek tetap untuk nilai pemuliaan ECM genetik pejantan dan induk (GECM), serta metode konsepsi kawanan × dan efek acak interaksi kawanan × tahun laktasi. Bilah kesalahan mewakili batas kepercayaan 95%. Berarti dengan huruf kecil yang berbeda (a–c) untuk nomor laktasi yang sama. berbeda dengan P<0,05 (a ≠ b). Konsepsi adalah cara dimana sapi dikandung. MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

Demikian pula, beberapa perbedaan dalam distribusi LPI diamati antara hewan AI, MOET, dan IVF. LPI bendungan rata-rata berkisar antara 2.027,17 ± 317.71 (rata-rata ± SD) untuk anak perempuan AI, 2.362.6 ± 342.17 untuk anak perempuan MOET, dan 2.420.05 ± 321.87 untuk anak perempuan IVF. Sebarannya lebih kecil untuk LPI bapak dengan skor rata-rata masing-masing 2,421.03 ± 361.88, 2,587.40 ± 328.21, dan 2,668.60 ± 277.27 untuk anak perempuan AI, MOET, dan IVF. Distribusi LPI induk pada 3 metode konsepsi tersedia di Tambahan Gambar S5 (https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022).

Pengaruh Faktor pada ECM. Pengaruh variabel yang dimasukkan dalam model dapat disajikan pada Tabel 8. Baginda GECM, dam GECM, dan interaksi antara jumlah laktasi dan metode konsepsi semuanya mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap ECM anak. Rata-rata kuadrat terkecil dari parameter konsepsi × angka laktasi, yang menyoroti interaksi antara paritas dan metode konsepsi, semuanya berbeda untuk kumpulan data "semua kelompok" dan berkisar antara 9.418 ± 69 kg (rata-rata ± SEM; AI) hingga 10,306 ± 144 kg (IVF) untuk laktasi pertama, 10,914 ± 69 kg (AI) menjadi 12,258 ± 160 kg (IVF) untuk laktasi kedua, dan 11,529 ± 69 kg (AI) hingga 13,213 ± 207 kg (IVF) untuk laktasi ketiga (Gambar 2). Sebaliknya, untuk kumpulan data "kelompok IVF", hewan dengan paritas lebih tinggi masih memiliki performa lebih baik dibandingkan hewan dengan paritas lebih rendah, namun metode konsepsi tidak mempengaruhi produksi dalam paritas tersebut. Jumlah tersebut berkisar antara 10.480 ± 117 kg (MOET) hingga 10.516 ± 148 kg (IVF) untuk laktasi pertama, 12.164 ± 106 kg (AI) hingga 12.465 ± 164 kg (IVF) untuk laktasi kedua, dan 12.782 ± 108 kg (AI) hingga 13,413 ± 0,214 kg (IVF) untuk laktasi ketiga (Gambar Tambahan S4;https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022).

Pengaruh potensi genetik induk, termasuk di sini dalam bentuk GECM pejantan dan induk, sangat signifikan di kedua kumpulan data (P<0,0001). Menghilangkan 2 variabel ini dalam model menyebabkan perkiraan nilai ECM yang lebih tinggi untuk hewan MOET dan IVF dalam analisis "semua kelompok". Pada "kelompok IVF", kurangnya parameter genetik mengakibatkan perbedaan yang signifikan pada laktasi kedua dan ketiga (Gambar Tambahan S7;https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafon- tain, 2022). Mengoreksi LPI orang tua dan bukan GECM juga menghasilkan kesimpulan yang sama.

Tabel 8. Pengaruh metode konsepsi, ECM genetik pejantan, ECM genetik induk, angka laktasi, dan angka laktasi × metode konsepsi terhadap hasil ECM laktasi sapi pada semua kelompok atau pada kelompok yang mengandung hewan IVF (IVF herds) dan komponen varian tahun laktasi , kelompok × konsepsi, kelompok × tahun laktasi, dan residu

	Efek tetap[2](*P*-nilai)					Komponen varians[3]			
Himpunan data[1]	Pembuahan	Baginda GECM	Sial GECM	Lakt_tidak	Lakt_tidak × pembuahan	tahun lalu	jam × pembuahan	jam × tahun laktat	Sisa
Semua ternak	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,03101	0,9983	0,2032	4.6329
kawanan IVF	0,0774	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0003	0,03313	0,9804	0,1703	5.0676

[1]IVF = fertilisasi in vitro.
[2]GECM = ECM genetik; Lakt_tidak. = nomor laktasi.
[3]Tahun Laktasi = tahun laktasi; Hrd = kawanan.

Indeks Kinerja Seumur Hidup

Kami menyelidiki selisih antara rata-rata LPI orang tua dan LPI anak perempuan. Rata-rata, anak perempuan AI dan MOET memiliki skor 14,29 ± 126,10 (rata-rata ± SD) dan 18,63 ± 122,59 poin lebih tinggi dibandingkan orang tuanya, sedangkan anak perempuan IVF memiliki skor 0,74 ± 126,36 poin lebih tinggi dibandingkan orang tua mereka (Gambar 3 A). Pemodelan statistik menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap metode konsepsi, PA LPI, dan tanggal lahir anak perempuan (Tabel 9). Rata-rata kuadrat terkecil dari efek metode konsepsi adalah 15,74 ± 1,08 (rata-rata ± SEM) untuk AI, 14,23 ± 1,97 untuk MOET, dan −3,34 ± 4,47 untuk IVF (Gambar 3B). Kami menemukan perbedaan antara IVF dan AI (*P*<0,0001), serta antara AI dan ET (*P*= 0,0009). Tanggal lahir dan PA berkorelasi positif dengan perbedaan LPI dengan koefisien regresi masing-masing sebesar 0,01218 ± 0,003003 (LPI_dif/hari) dan 0,005424 ± 0,000896 (LPI_dif/PA_LPI).

Perkiraan dampak LPI selama setahun juga menunjukkan perbedaan tingkat perbaikan antar metode konsepsi (Gambar 4). Jika melihat data tanpa penyesuaian statistik untuk dampak lainnya, tingkat peningkatan untuk AI adalah 98,06 ± 0,25 poin LPI per tahun, 71,09 ± 1,12 poin per tahun untuk MOET, dan 48,33 ± 5,49 poin per tahun untuk IVF (Gambar Tambahan S8; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022).

Kesuburan

DF.Untuk menyelidiki potensi dampak terhadap kesuburan, kami melihat indeks DF pada 3 metode konsepsi. Sapi MOET dan IVF memiliki peringkat lebih rendah dibandingkan sapi AI (*P*<0,05; Gambar Tambahan S9; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). Untuk lebih mengisolasi potensi efek epigenetik dari metode pemuliaan, kami menghitung perbedaan antara skor DF anak perempuan dan rata-rata DF orang tua (DF_Dif). Hal ini memungkinkan kami untuk mengidentifikasi penyimpangan dari nilai yang diharapkan untuk anak perempuan tersebut. Metode konsepsi, PA DF, dan tanggal lahir anak perempuan mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap DF_Dif (Tabel 10).

DF anak perempuan MOET dan IVF lebih rendah dibandingkan skor orangtuanya dengan rata-rata 1,17 poin, sedangkan DF anak perempuan AI lebih rendah dibandingkan skor orangtuanya sebesar 0,34 poin (*P*< 0,05; Gambar 5).

Interval dari Servis Pertama hingga Konsepsi.Waktu yang berlalu antara pembiakan pertama dan saat pembuahan dicapai bervariasi dalam kaitannya dengan metode pembuahan yang digunakan untuk menghasilkan sapi, baik dalam "semua ternak" (*P*=0,0099) dan "kelompok IVF" (*P*= 0,0024). Hewan dengan fertilisasi in vitro rata-rata memerlukan waktu antara 3,06 dan 4,44 hari lebih lama untuk dapat dikandung dibandingkan hewan AI dan MOET (Tabel 5).

Usia pada Layanan Pertama.Usia sapi dara pertama kali dikawinkan sangat bergantung pada pengelolaan, seperti yang ditunjukkan oleh komponen varians konsepsi kelompok x yang menjelaskan masing-masing 42% dan 29% varians pada "semua kelompok" dan "kelompok IVF" (Tabel 11). Namun, di "semua kelompok," dampak konsepsi yang signifikan teridentifikasi, dengan hewan MOET dan IVF dibiakkan untuk pertama kalinya 6,77 (*P*<0,0001) dan 9,93 (*P*=0,026) hari lebih awal dibandingkan sapi dara AI. Kami tidak menemukan perbedaan antara metode konsepsi pada "kelompok IVF" (Tabel 6).

Interval Pembiakan.Dalam kasus kembalinya estrus, melihat interval antara 2 layanan memberi kita petunjuk tentang apa yang menyebabkan kegagalan tersebut. Kami berasumsi bahwa 2 perkawinan berturut-turut yang terjadi kurang dari 30 hari kemungkinan besar disebabkan oleh masalah gamet atau saluran reproduksi yang menghalangi pembuahan atau menyebabkan kematian embrio praimplantasi dini. Kegagalan konsepsi awal ini menyebabkan sapi tersebut melakukan siklus lagi. Namun, interval perkembangbiakan yang lebih dari 30 hari berpotensi menimbulkan penundaan dalam siklus estrus normal sapi, yang kami kaitkan dengan embrio yang telah cukup berkembang sehingga sinyal pengenalan kebuntingan telah terjadi. Kami menggunakan asumsi ini untuk menghasilkan hasil biner berikut: interval pembiakan ≤30 hari atau interval pembiakan >30 hari. Perlu dicatat bahwa perluasan peternakan di-

Tabel 9. Pengaruh metode konsepsi, rata-rata Indeks Kinerja Seumur Hidup orang tua, dan tanggal lahir terhadap rata-rata perbedaan Indeks Kinerja Seumur Hidup orang tua-anak perempuan dan komponen varians dari kelompok × konsepsi dan residu

	Efek tetap[2] (*P*-nilai)			Komponen varians[3]	
Himpunan data[1]	Pembuahan	PA	Tanggal lahir	Hrd × konsepsi	Sisa
Semua ternak	<0,0001	<0,0001	<0,0001	33.0934	14.756
kawanan IVF	0,0002	<0,0001	<0,0001	103,98	15.601

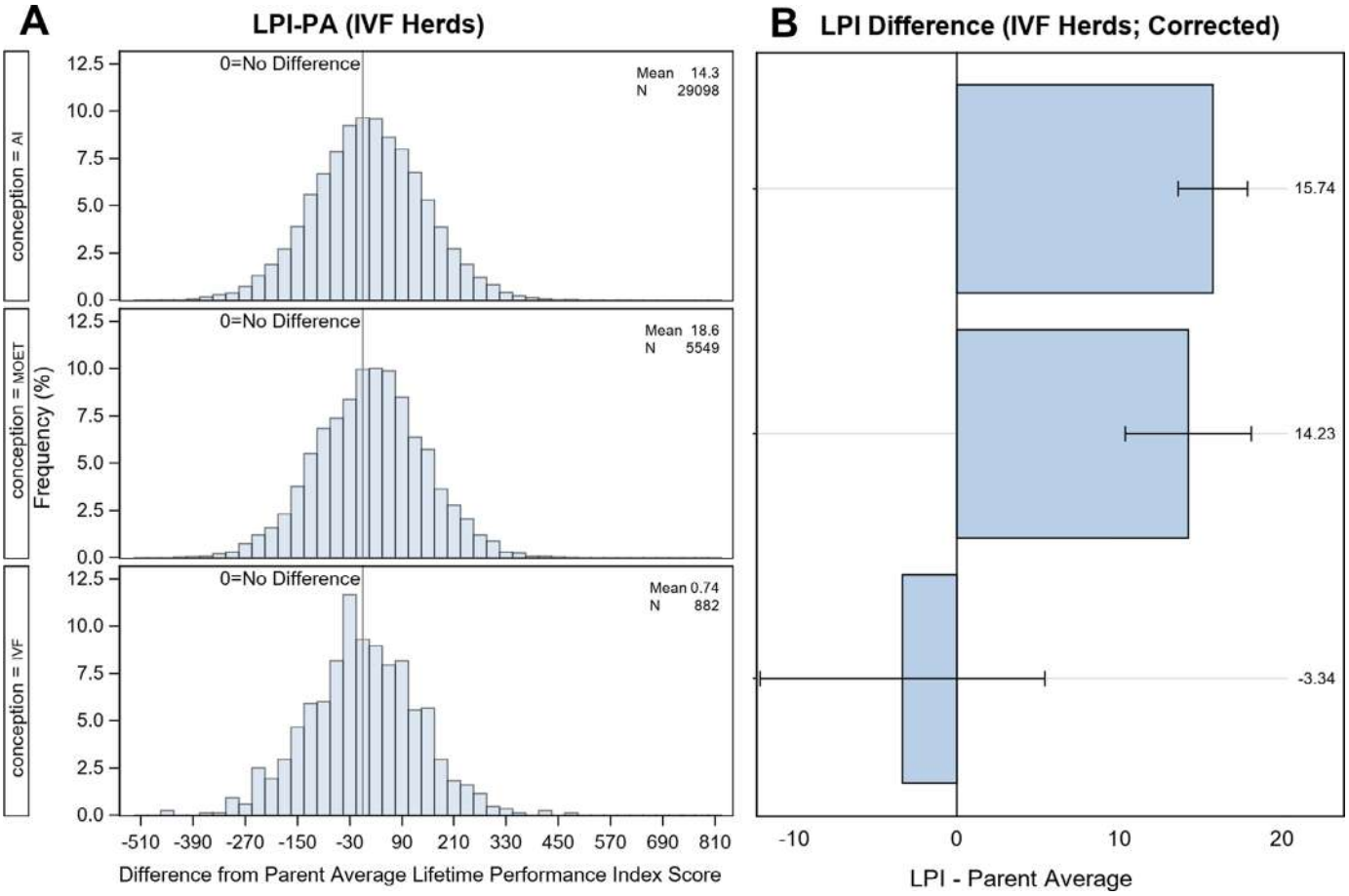
[1]IVF = fertilisasi in vitro.

[2]PA = rata-rata orang tua.

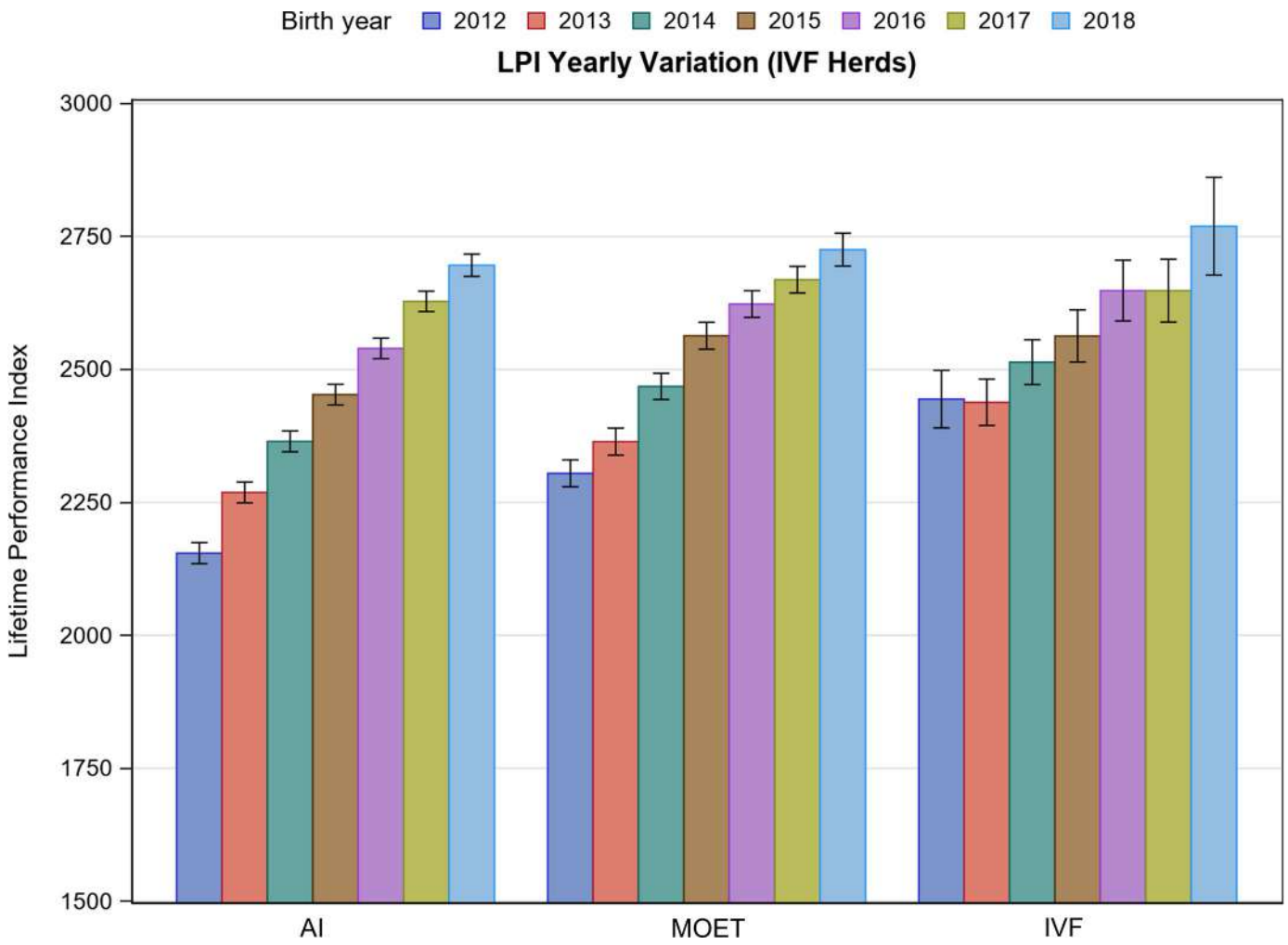
[3]Hrd = kawanan.

terval dapat disebabkan oleh faktor lain seperti kurangnya deteksi estrus.

Pada kumpulan data "semua kelompok", kami menemukan interaksi yang signifikan antara paritas dan metode konsepsi (Tabel 12), namun perbedaannya hanya antara Hewan AI dan MOET untuk paritas pertama dan kedua. Sapi transfer embrio yang berovulasi ganda memiliki kemungkinan penurunan kematian embrio [rasio odds paritas pertama = 0,854; CI 95% (0,808, 0,903) dan rasio odds paritas kedua = 0,880; 95% CI (0,830, 0,934)]. Signifikansinya



Gambar 3. Perbedaan indeks kinerja seumur hidup (LPI) antara rata-rata anak perempuan dan orang tua (PA; LPI anak perempuan – PA LPI). Nilai positif mewakili nilai anak perempuan yang lebih baik daripada rata-rata LPI bapak dan ibu; demikian pula, nilai negatif menunjukkan kinerja anak perempuan yang buruk dalam indeks sehubungan dengan potensi genetiknya. (A) Distribusi perbedaan LPI antar metode konsepsi untuk anak perempuan dalam kelompok yang mengandung setidaknya 1 ekor sapi keturunan IVF. (B) Konsepsi metode LSM. Model statistik yang digunakan juga mencakup efek tetap untuk rata-rata LPI orang tua dan tanggal lahir anak perempuan serta efek acak untuk interaksi metode konsepsi kelompok ×. Bilah kesalahan mewakili batas kepercayaan 95%. Konsepsi adalah cara dimana sapi dikandung. MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.



Gambar 4. Indeks kinerja seumur hidup (LPI) berdasarkan tahun dan metode konsepsi untuk sapi dalam kelompok yang berisi setidaknya 1 sapi yang berasal dari IVF: Tahun kelahiran sapi × interaksi metode konsepsi LSM. Model statistik yang digunakan juga mencakup efek acak interaksi metode konsepsi kawanan ×. Bilah kesalahan mewakili batas kepercayaan 95%. Konsepsi adalah cara dimana sapi dikandung. MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

Interaksi yang tidak biasa antara paritas dan metode konsepsi juga terjadi pada "kelompok IVF". Namun, setelah melakukan koreksi terhadap beberapa perbandingan, tidak ada perbedaan yang dapat diamati antara berbagai metode konsepsi pada sapi dengan nomor paritas yang sama.

DISKUSI

Dalam studi ini, kami menemukan bahwa metode konsepsi MOET dan IVF memiliki efek jangka panjang yang menguntungkan terhadap produksi susu bila dibandingkan pada "semua ternak," namun

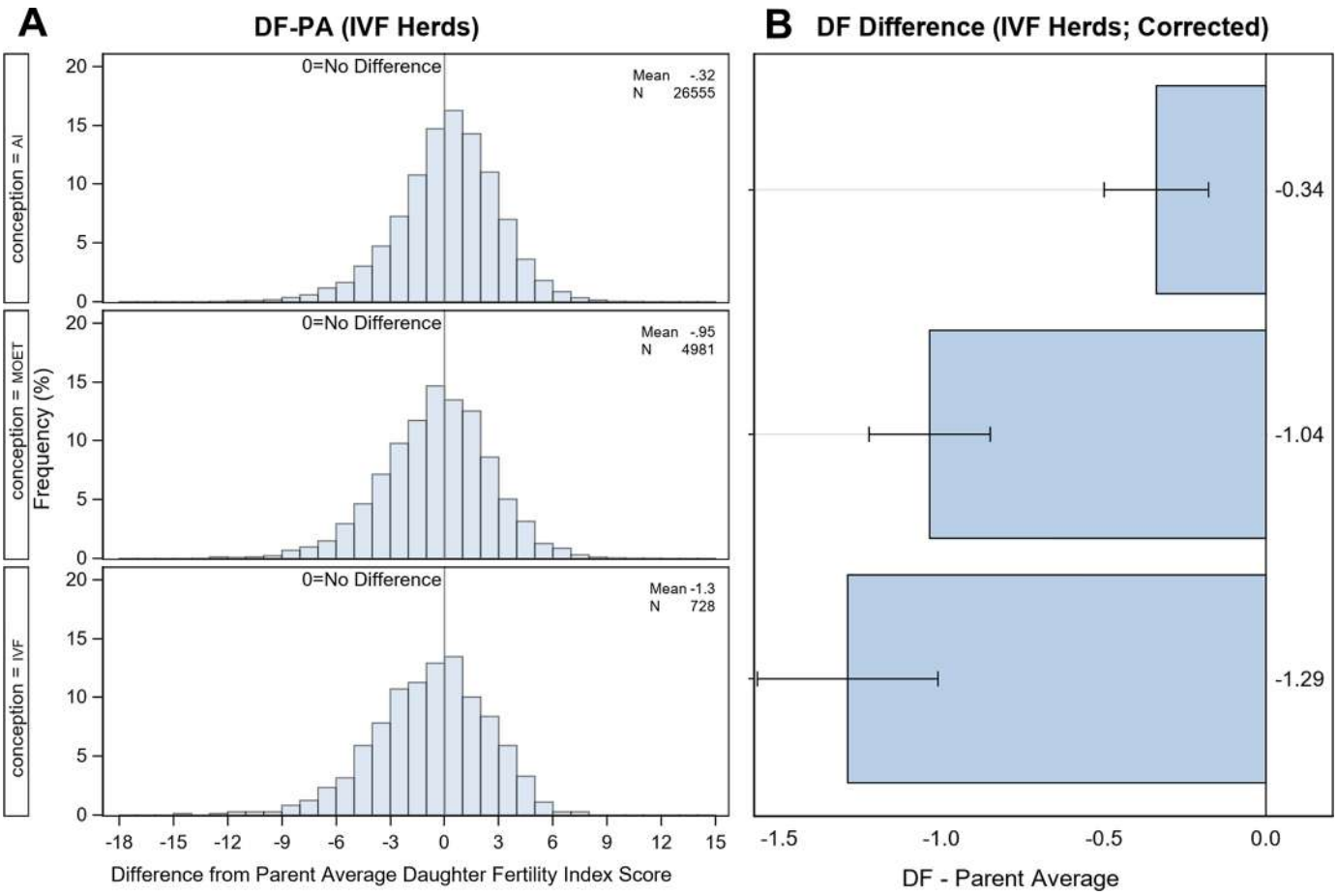
Tabel 10. Pengaruh metode konsepsi, rata-rata kesuburan anak perempuan orang tua, dan tanggal lahir terhadap rata-rata kesuburan anak perempuan orang tua, perbedaan kesuburan anak perempuan dan komponen varians dari kelompok × konsepsi dan residu

	Efek tetap[2](*P*-nilai)			Komponen varians[3]	
Himpunan data[1]	Pembuahan	PA	Tanggal lahir	Hrd × konsepsi	Sisa
Semua ternak	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7389	6.2709
kawanan IVF	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1.2013	6.4934

[1]IVF = fertilisasi in vitro.

[2]PA = rata-rata orang tua.

[3]Hrd = kawanan.



Gambar 5. Selisih indeks kesuburan anak perempuan (DF) antara rata-rata anak perempuan dan orang tua (PA) (DF anak perempuan – PA DF). Nilai positif mewakili anak perempuan yang mendapat skor lebih baik daripada rata-rata ayah dan ibunya DF; demikian pula, nilai negatif menunjukkan kinerja anak perempuan yang buruk dalam indeks sehubungan dengan potensi genetiknya. (A) Distribusi perbedaan DF pada metode konsepsi untuk anak perempuan dalam kelompok yang mengandung setidaknya 1 sapi keturunan IVF. (B) Konsepsi metode LSM. Model statistik yang digunakan juga mencakup efek tetap untuk rata-rata DF orang tua dan tanggal lahir anak perempuan serta efek acak untuk interaksi metode konsepsi kelompok ×. Bilah kesalahan mewakili batas kepercayaan 95%. Konsepsi adalah cara dimana sapi dikandung. MOET = transfer embrio ovulasi ganda; IVF = fertilisasi in vitro.

perbedaannya tidak signifikan pada kelompok yang memiliki setidaknya 1 hewan IVF. Metode konsepsi IVF memiliki efek negatif ringan terhadap kesuburan bila dinormalisasi berdasarkan faktor genetik orang tua.

Faktor Perancu

Hal yang serupa dengan studi kohort retrospektif mengenai dampak ART pada sapi dan manusia adalah pengaitan pengobatan yang tidak acak terhadap populasi. Pada manusia, pasien yang menjalani ART cenderung menderita kondisi yang menyebabkan subfertilitas atau infertilitas yang kemudian dikaitkan dengan dampak buruk pada embrio, perkembangan pascakelahiran, atau keduanya (Feuer dkk., 2013; Fauser dkk., 2014). Sebaliknya, sapi yang berasal dari ART cenderung merupakan keturunan hewan yang paling berharga dalam populasi dalam hal genetik. potensinya sehingga orang tuanya memiliki kemampuan yang lebih tinggi dalam memproduksi susu dan tetap sehat serta subur (Mueller dan Van Eenennaam, 2022). Nilai ekonomi yang lebih tinggi terkait dengan sifat-sifat ini membuat hewan ART ini (baik induk maupun anakan) rentan menerima perlakuan yang berbeda dibandingkan dengan sapi pada umumnya, sehingga menimbulkan bias lingkungan (pengelolaan) yang mungkin memperparah bias genetik yang disebutkan di atas. Untuk menghindari tantangan ini, beberapa metode analisis digunakan dalam penelitian ini. Untuk mengatasi perbedaan dalam pengelolaan, kami melakukan pemodelan statistik pada semua data yang tersedia (kumpulan data “semua kelompok”), serta pada kumpulan data yang lebih terbatas (kumpulan data “kelompok IVF”), yang hanya mencakup kelompok yang berisi 1 atau lebih sapi keturunan IVF selama periode penelitian. Kami berhipotesis bahwa membatasi analisis pada kelompok hewan IVF memungkinkan dilakukannya perbandingan yang lebih langsung

Tabel 11. Pengaruh pada usia saat servis pertama

	Efek tetap[2] (*P*-nilai)			Komponen varians[3]	
Himpunan data[1]	Pembuahan	PADF	Tanggal lahir	Hrd × konsepsi	Sisa
Semua ternak	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1.008,82	1.424,21
kawanan IVF	0,6431	0,0593	<0,0001	683.39	1.634,36

[1]IVF = fertilisasi in vitro.

[2]PADF = rata-rata kesuburan anak perempuan orang tua.

[3]Hrd = kawanan.

hewan ART ke rekan-rekan mereka dan membatasi variabilitas pengelolaan ternak. Di sisi lain, hasil perbandingan yang dibuat dengan kumpulan data "semua kelompok" lebih menunjukkan perbedaan yang disebabkan oleh metode konsepsi pada ras Holstein secara umum.

Metode lain digunakan untuk mengontrol dan mengoreksi perbedaan potensi genetik dan ditangani di bagiannya masing-masing. Metode ini termasuk menambahkan nilai pemuliaan induk sebagai kovariat, atau dalam beberapa kasus, melihat deviasi anak perempuan dari rata-rata induk untuk membatasi bias ini.

Produksi Susu Serupa dengan Potensi Genetik Konstan

Teknologi reproduksi berbantuan digunakan dalam program pemuliaan sapi perah untuk mempercepat pengembangan hewan dengan potensi genetik tinggi dan dengan cepat menyebarkan keuntungan genetik tersebut. Pengamatan kami mendukung kerangka tersebut, karena sapi yang berasal dari MOET, dan terlebih lagi dari IVF, cenderung memiliki skor LPI induk yang lebih tinggi (Gambar Tambahan S5;https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022) dan GECM (Gambar Tambahan S6;https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022), sehingga nilai ECM tercatat lebih tinggi (Gambar 1).

Demikian pula, dengan tidak mengoreksi nilai GECM yang lebih tinggi tersebut, model statistik kami menunjukkan perbedaan sebesar + 647 kg (P=0,007) dan + 976 kg (P<0,0036) untuk hewan IVF pada laktasi kedua dan ketiga (Supplemental Gambar S7;https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). Namun, dengan memperkenalkan dam GECM dan bapak GECM sebagai kovariat dalam model kami untuk mengkompensasi atribusi metode konsepsi yang tidak acak di seluruh nilai GECM, kami tidak menemukan perbedaan antara metode konsepsi (Gambar Tambahan S4; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya (Siqueira et al., 2017; Baruselli et al., 2021), dimana tidak ditemukan perbedaan antara AI, IVF, dan MOET pada laktasi pertama. Namun, Siqueira dkk. (2017) mengamati penurunan hasil susu, protein, dan lemak pada laktasi pertama sapi yang berasal dari IVF ketika semen yang disortir X terbalik digunakan. Dalam kumpulan data "semua kelompok" dan "kelompok IVF", terdapat interaksi paritas X metode konsepsi, yang mengacu pada respons variabel terhadap metode konsepsi seiring dengan bertambahnya usia sapi. Namun, setelah menyesuaikan beberapa perbandingan, kami tidak memiliki kekuatan statistik untuk mengidentifikasi perbedaan antara metode konsepsi dalam paritas kelompok IVF.

Tabel 12. Pengaruh metode pembuahan, jumlah paritas sebelumnya (paritas) dan konsepsi × paritas terhadap interval perkembangbiakan (kematian embrio)

	Efek tetap[2] (*P*-nilai)			
Himpunan data[1]	Pembuahan	Keseimbangan	Pembuahan × paritas	PADF
Semua ternak	<0,0001	0,6584	0,0015	<0,0001
kawanan IVF	0,1419	0,5363	0,0284	0,0020

[1]IVF = fertilisasi in vitro.

[2]PADF = rata-rata kesuburan anak perempuan orang tua.

Kelebihan Genetik Lebih Rendah Dibandingkan dengan PA

Untuk mendapatkan gambaran yang lebih holistik mengenai performa hewan secara keseluruhan berdasarkan metode konsepsi, kami beralih ke indeks genetik standar yang digunakan oleh produsen Kanada, yaitu LPI. Karena kami mengharapkan keturunannya mewarisi nilai rata-rata pemuliaan dari induknya, kami berhipotesis bahwa efek epigenetik dari metode konsepsi akan terwujud dalam bentuk bias dalam pengambilan sampel Mendel, yang berarti skor untuk anak perempuan akan berbeda dari skor rata-rata. untuk orang tua. Untuk mengeksplorasi gagasan ini, kami merancang variabel sederhana yang dihitung dengan mengurangkan rata-rata LPI orang tua dari LPI anak perempuannya. Kami menemukan bahwa anak perempuan MOET dan AI cenderung memperoleh 14 dan 16 poin LPI dibandingkan orang tua mereka, peningkatan sebesar 0,06% berdasarkan rata-rata LPI global sebesar 2.235. Namun, kecenderungan positif ini tidak diamati pada hewan yang diturunkan dari IVF (Gambar 3B).

Meskipun penelitian kami tidak dapat menunjukkan modifikasi kromatin atau jalur fisiologis tertentu, kami

bagian yang jelas dari perbedaan yang diamati dengan perubahan epigenetik karena alasan berikut: karena perbedaan fenotip hewan (LPI anak perempuan) tidak sepenuhnya dijelaskan oleh genotipe (PA LPI) atau oleh lingkungan (efek acak kawanan dan tanggal lahir), kami berasumsi bahwa perbedaan tersebut merupakan hasil interaksi genotipe × lingkungan, yang dapat dimediasi oleh mekanisme epigenetik (Liu et al., 2008; Ladd-Acosta dan Fallin, 2016). Memang benar, perbedaan ini bisa jadi disebabkan oleh gangguan epigenetik yang menyebabkan perkembangan kurang optimal dan kemudian menurunkan kinerja, kesehatan, kesuburan, atau keduanya. Fakta bahwa embrio MOET tidak berbeda dengan embrio AI membuat kami berhipotesis bahwa efek negatif tersebut kemungkinan disebabkan oleh prosedur yang tidak dilakukan oleh MOET dan IVF, yaitu pematangan in vitro, IVF, dan kultur embrio. Faktor perancu yang mungkin terjadi adalah nilai rata-rata orang tua yang bias, sehingga menyebabkan anak-anaknya dianggap memiliki kinerja yang berlebihan atau kurang. Namun, mengintegrasikan keandalan LPI induk dan bendungan ke dalam model tidak mempengaruhi kesimpulan kami.

Tingkat Kemajuan Genetik yang Lebih Lambat

Kami menyelidiki lebih lanjut hubungan positif antara LPI dan tanggal lahir. Kami mengamati bahwa pada tahun tertentu, LPI lebih tinggi pada populasi IVF, namun peningkatan dari tahun ke tahun lebih rendah dibandingkan dengan AI dan MOET (Gambar 4). Meskipun alasan spesifik atas lambatnya kemajuan tersebut sulit diidentifikasi, penurunan laju kemajuan tersebut sejalan dengan dampak buruk ART terhadap pembangunan, sehingga menurunkan perolehan per generasi. Alasannya mungkin tidak sepenuhnya bersifat epigenetik dan salah satu faktor yang berkontribusi adalah kemungkinan terjadinya error positif antar generasi lebih kecil pada populasi genetik elit yang kecil. Tren peningkatan relatif dalam produksi susu maksimum tahunan (kg/sapi/tahun) di Amerika Serikat menunjukkan bahwa produsen susu tertinggi mengalami peningkatan lebih lambat dibandingkan sebelumnya, namun masih dengan kecepatan yang lebih tinggi dibandingkan rata-rata produksi susu Amerika (Brito et al., 2021). Meskipun mungkin terjadi, stagnasi kemajuan genetik karena kehabisan variasi genetik dianggap tidak mungkin terjadi, terutama mengingat sifat luas dari sifat-sifat yang dimasukkan dalam indeks (Janick, 2010; Hill, 2016). Sepengetahuan kami, tren perbaikan genetik yang lebih lambat pada sapi yang menggunakan ART belum pernah dilaporkan sebelumnya dan memerlukan penelitian lebih lanjut.

Rata-rata Kesuburan Lebih Rendah Dibandingkan dengan PA

Fenomena serupa dengan perbedaan LPI-PA juga diamati pada subindeks DF. Kali ini perbedaan antara AI dan 2 metode ART: IVF dan MOET (Gambar 5).

Perbedaan ini menunjukkan bahwa efek kesuburan dikaitkan dengan kondisi umum produksi embrio IVF dan MOET, termasuk pengobatan hormonal donor dalam kasus stimulasi ovarium atau superovulasi, paparan terhadap lingkungan ex vivo (lebih luas untuk IVF, lebih pendek dan tidak terlalu mengganggu untuk MOET), dan protokol persiapan penerima.

Perkembangan oosit adalah periode kritis untuk pemrograman karena beberapa faktor ibu terakumulasi selama fase ini, banyak di antaranya yang berperan dalam pemeliharaan jejak selama perkembangan embrio (Denomme dan Mann, 2013; Farhadova et al., 2019). Perubahan kondisi ovarium akibat hormon eksogen dapat mengganggu pemrograman oosit, sehingga menyebabkan perbedaan ekspresi gen pada embrio (Mundim et al., 2009).

Embrio MOET dan IVF terkena kondisi yang berbeda dari saluran reproduksi wanita; misalnya paparan cahaya (Oh et al., 2007; Ottosen et al., 2007), konsentrasi oksigen (Skiles et al., 2018; de Lima et al., 2020), atau komposisi kultur/media transfer (Enright dkk., 2000; Simopoulou dkk., 2018; de Lima dkk., 2020). Hal ini ditunjukkan dengan rendahnya parameter kesuburan seperti konsentrasi dan motilitas sperma pada mencit jantan hasil kultur embrio in vitro. Parameter kesuburan yang lebih rendah ini pada gilirannya menyebabkan penurunan angka kehamilan (Calle et al., 2012). Bukti lebih lanjut yang secara khusus menunjukkan manipulasi embrio adalah kurangnya perbedaan kesuburan antar generasi dan antar generasi antara embrio tikus yang telah menjalani kultur in vitro atau yang langsung ditransfer ke penerima (Mahsoudi et al., 2007). Namun perbandingan tersebut tidak mencakup perkawinan alami atau keturunan yang diturunkan dari AI.

Untuk lebih mengisolasi penyebab rendahnya skor indeks pada hewan IVF dan MOET, kami melihat masing-masing komponen seperti interval dari layanan pertama hingga pembuahan. Analisis kami menunjukkan bahwa hewan IVF memerlukan rata-rata 3,06 hingga 4,44 hari lebih lama untuk bisa hamil, yang berarti sekitar satu siklus tambahan untuk mencapai kebuntingan setiap 5 hingga 6 ekor sapi. Kami mencoba memeriksa penyebab kegagalan pemuliaan ini dengan melihat interval antara setiap layanan yang berurutan. Meskipun hewan MOET tampaknya mengalami kegagalan reproduksi yang terjadi lebih awal setelah inseminasi dibandingkan hewan AI, kami tidak dapat secara spesifik menunjukkan adanya perubahan tertentu pada kematian embrio sapi ART.

Faktor lain dalam subindeks DF, yaitu usia pertama kali menerima layanan, menunjukkan bahwa hewan MOET dan IVF memasuki masa reproduksi pada usia yang lebih muda dibandingkan dengan populasi lainnya. Hal ini berpotensi mengimbangi skor negatif pada beberapa ciri kesuburan lainnya. Namun, perbedaan tersebut tidak terlihat pada kumpulan data “kelompok IVF”, yang selanjutnya menunjukkan besarnya pengaruh manajemen terhadap usia pertama kali mendapatkan layanan.

KESIMPULAN

Efek epigenetik jangka panjang dari ART masih sulit diukur. Namun, sapi dari industri susu Kanada merupakan kandidat yang cocok untuk studi kohort skala besar karena banyaknya data yang dihasilkan oleh pemangku kepentingan industri. Konteks ini menjadikan penelitian ini sebagai penelitian pertama dalam skala ini yang membandingkan metode konsepsi. Hasil kami menunjukkan bahwa hewan IVF lebih produktif dibandingkan populasi Holstein pada umumnya, namun tidak secara signifikan lebih produktif dibandingkan hewan lain dalam kelompoknya (kelompok IVF). Teknologi reproduksi berbantuan yang digunakan tampaknya tidak memberikan dampak negatif terhadap produksi susu, yang merupakan faktor ekonomi penting dan berperan dalam kesehatan metabolisme sapi. Di sisi lain, hukumannya tampaknya berupa sedikit penurunan kesuburan hewan MOET dan IVF, dan lambatnya pertumbuhan nilai perkembangbiakan populasi IVF. Pekerjaan ini akan memungkinkan produsen untuk membuat keputusan yang lebih tepat mengenai metode konsepsi yang akan digunakan pada ternak mereka dan memungkinkan industri genetika susu untuk mengatasi masalah yang teridentifikasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dewan Riset Ilmu Pengetahuan Alam dan Teknik Kanada—Penelitian dan Pengembangan Kolaboratif (NSERC ALLRP 547639-19; Ottawa, ON, Kanada) dengan Novalait (Québec, QC, Kanada), SE-MEX (Saint-Hyacinthe, QC, Kanada), dan Lactanet (Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Kanada) sebagai mitra industri yang menyediakan dana untuk penelitian ini. S. Lafontaine menerima dukungan beasiswa dari Fonds de Recherche du Québec—Nature et Technologies (FRQNT; Québec, QC, Kanada). Kami berterima kasih kepada René Lacroix (Lactanet), Gerrit Kistemaker (Lactanet), dan Pascal Lemire (Holstein Canada; Brantford, ON, Canada) atas saran dan kontribusi mereka dalam persiapan data. Penulis belum menyatakan adanya konflik kepentingan.

REFERENSI

Baruselli, PS, CA Rodrigues, RM Ferreira, Penjualan JNS, FM Elliff, LG Silva, MP Viziack, L. Factor, dan MJ D'Occhio. 2021. Dampak usia dan ras donor oosit terhadap produksi embrio in vitro pada sapi, dan hubungan penerima embrio susu dan daging sapi terhadap kehamilan dan performa keturunan selanjutnya: Sebuah tinjauan. mereproduksi. Subur. Dev. 34:36.https://doi.org/10 . 1071/RD21285.

Bonilla, L., J. Block, AC Denicol, dan PJ Hansen. 2014. Konsekuensi-urutan transfer embrio yang diproduksi secara in vitro untuk induk dan anak sapi yang dihasilkan. J. Ilmu Susu. 97:229–239.https://doi.org/10 . 3168/jds.2013-6943.

Brito, LF, N. Bedere, F. Douhard, HR Oliveira, M. Arnal, F. Peñagaricano, AP Schinckel, CF Baes, dan F. Miglior. 2021. Ulasan: Seleksi genetik sapi perah dengan hasil tinggi menuju sistem peternakan berkelanjutan di dunia yang berubah dengan cepat. Hewan 15:100292.https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100292.

Calle, A., A. Miranda, R. Fernandez-Gonzalez, E. Pericuesta, R. Laguna, dan A. Gutierrez-Adan. 2012. Tikus jantan hasil kultur in vitro mengalami penurunan kesuburan dan menularkan intoleransi organomegali dan glukosa kepada keturunan jantannya. biologi. mereproduksi. 87:1–9. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100743.

Caramaschi, D., J. Jungius, CM Page, B. Novakovic, R. Saffery, J. Halliday, S. Lewis, MC Magnus, SJ London, SE Håberg, CL Relton, DA Lawlor, dan HR Elliott. 2021. Asosiasi reproduksi yang dibantu secara medis dengan metilasi DNA darah tali pusat antar kelompok. Bersenandung. mereproduksi. 36:2403–2413.https://doi.org/10.1093/humrep/deab137.

CDN. 2022. Jaringan Susu Kanada - Indeks Kinerja Seumur Hidup (LPI) Rumus. Diakses 19 April 2022.https://www.cdn.ca/document.php?id=443.

Ceelen, M., MM van Weissenbruch, JPW Vermeiden, FE van Leeuwen, dan HA Delemarre-van de Waal. 2008. Perbedaan kardiometabolik pada anak yang lahir setelah fertilisasi in vitro: Studi lanjutan. J.Klin. Endokrinol. Metab. 93:1682–1688.https://doi.org/10.1210/jc.2007-2432.

Chen, M., dan LK Heilbronn. 2017. Hasil kesehatan manusia keturunan yang dikandung melalui teknologi reproduksi berbantuan (ART). J.Dev. Asal. Dis Kesehatan. 8:388–402.https://doi.org/10.1017/S2040174417000228.

Chen, W., Y. Peng, X. Ma, S. Kong, S. Tan, Y. Wei, Y. Zhao, W. Zhang, Y. Wang, L. Yan, dan J. Qiao. 2020. Multiomik terintegrasi mengungkap gangguan epigenomik pada teknologi reproduksi berbantuan pada keturunan manusia. EBioMedicine 61:103076.https://doi . org/10.1016/j.ebiom.2020.103076.

Chen, Z., KM Robbins, KD Wells, dan RM Rivera. 2013. Besar sindrom keturunan. Epigenetika 8:591–601.https://doi.org/10 . 4161/epi.24655.

Choufani, S., AL Turinsky, N. Melamed, E. Greenblatt, M. Brudno, A. Bérard, WD Fraser, R. Weksberg, J. Trasler, P. Monnier, WD Fraser, F.Audibert, L.Dubois, P.Julien, Z.-C. Luo, J.Michaud, J.-M. Moutquin, G. Muckle, J. Séguin, J. Trasler, RE Tremblay, H. Abenhaim, M.-J. Bédard, A. Bérard, E. Bujold, R. Gagnon, I. Girard, Z. Kibar, I. Marc, P. Monnier, M.-N. Simard, J.-C. Pasquier, dan M. Welt. 2019. Dampak reproduksi terbantu, infertilitas, jenis kelamin dan faktor ayah terhadap metilom DNA plasenta. Bersenandung. mol. Genet. 28:372–385.https://doi.org/10 . 1093/hmg/ddy321.

Choux, C., C. Binquet, V. Carmignac, C. Bruno, C. Chapusot, J. Barbaret, M. Lamotte, P. Sagot, D. Bourc'his, dan P. Fauque. 2018. Kontrol epigenetik atas elemen transposabel dan gen yang tercetak pada bayi baru lahir dipengaruhi oleh cara pembuahan: ART versus konsepsi spontan tanpa penyebab infertilitas. Bersenandung. mereproduksi. 33:331–340.https://doi.org/10.1093/humrep/dex366.

Cole, JB, SAE Eaglen, C. Maltecca, HA Mulder, dan JE Pryce. 2020. Masa depan fenomena peternakan sapi perah. animasi. Depan. 10:37–44.https://doi.org/10.1093/af/vfaa007.

de Lima, CB, É. C. dos Santos, J. Ispada, PK Fontes, MFG Nogueira, CMD dos Santos, dan anggota parlemen Milazzotto. 2020. Dinamika antara kultur in vitro dan metabolisme: adaptasi embrio terhadap perubahan lingkungan. Sains. Ulangan 10:15672.https://doi . org/10.1038/s41598-020-72221-1.

Denomme, MM, dan MRW Mann. 2013. Kontrol ibu terhadap kehamilan pemeliharaan jejak nomik. mereproduksi. Bioma. Daring 27:629–636. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.004.

Enright, BP, P. Lonergan, A. Dinnyes, T. Fair, FA Ward, X. Yang, dan anggota parlemen Boland. 2000. Kultur in vitro menghasilkan zigot sapi in vitro vs in vivo: Implikasi terhadap perkembangan dan kualitas embrio awal. Teriogenologi 54:659–673.https://doi.org/10 . 1016/S0093-691X(00)00381-2.

Farhadova, S., M. Gomez-Velazquez, dan R. Feil. 2019. Stabilitas dan lakemampuan jejak metilasi orang tua dalam perkembangan dan penyakit. Gen (Basel) 10:999.https://doi.org/10.3390/genes10120999.

Farin, PW, JA Piedrahita, dan CE Farin. 2006. Kesalahan dalam deperkembangan janin dan plasenta dari embrio sapi yang diproduksi secara in vitro. Teriogenologi 65:178–191.https://doi.org/10.1016/j . theriogenologi.2005.09.022.

Fauser, BCJM, P. Devroey, K. Diedrich, B. Balaban, M. Bonduelle, HA Delemarre-van de Waal, C. Estella, D. Ezcurra, JPM Geraedts, CM Howles, L. Lerner-Geva, J. Serna, dan D. Wells. 2014. Hasil kesehatan anak yang lahir setelah IVF/ICSI: Tinjauan pendapat ahli dan literatur terkini. mereproduksi. Bioma. Daring 28:162–182. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.013. Feuer, SK, L. Camarano, dan PF Rinaudo. 2013. SENI dan kesehatan: Hasil klinis dan wawasan tentang mekanisme molekuler dari penelitian hewan pengerat. mol. Bersenandung. mereproduksi. 19:189–204.https://doi.org/10 . 1093/molehr/gas066.

Gkourogianni, A., I. Kosteria, AG Telonis, A. Margeli, E. Mantzou, M. Konsta, D. Loutradis, G. Mastorakos, I. Papassotiriou, MI Klapa, C. Kanaka-Gantenbein, dan GP Chrousos. 2014. Profil metabolik plasma menunjukkan indikasi awal kecenderungan resistensi insulin laten pada anak yang dikandung melalui ICSI. PLoS Satu 9:e94001.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094001. Grace, KS, dan KD Sinclair. 2009. Teknologi reproduksi berbantuan teknologi, epigenetika, dan kesehatan jangka panjang: Sebuah bom waktu perkembangan masih terus berjalan. Semin. mereproduksi. medis. 27:409–416. https://doi . org/10.1055/s-0029-1237429.

Halliday, J., S. Lewis, J. Kennedy, DP Burgner, M. Juonala, K. Hammarberg, DJ Amor, LW Doyle, R. Saffery, S. Ranganathan, L. Welsh, M. Cheung, J. McBain, SJC Hearps, dan R. McLachlan. 2019. Kesehatan orang dewasa usia 22 hingga 35 tahun yang dikandung dengan teknologi reproduksi berbantuan. Subur. Steril. 112:130–139. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.001.

Hill, WG 2016. Apakah perbaikan genetik berkelanjutan dari keberlanjutan ternak dapat dipertahankan? Genetika 202:877–881.https://doi.org/10.1534/genetics.115.186650.

IETS. 2020. 2019 Statistik produksi dan transfer embrio di dohewan ternak mestik. Halaman 1–15 dalam Buletin Teknologi Embrio.

Jamrozik, J., GJ Kistemaker, TCS Chud, dan FS Schenkel. 2020. Estimasi parameter genetik sifat efisiensi pakan Holstein. CDN 9.

Janick, J. 2010. Seleksi jangka panjang: Tanaman, hewan, dan bakteri. Halaman 169–207 dalam Ulasan Pemuliaan Tanaman. John Wiley & Putra. Koltes, JE, JB Cole, R. Clemmens, RN Dilger, LM Kramer, JK Lunney, ME McCue, SD McKay, RG Mateescu, B. M. Murdoch, R. Reuter, CE Rexroad, GJM Rosa, NV L. Serão, SN White, MJ Woodward-Greene, M. Worku, H. Zhang, dan JM Reecy. 2019. Visi untuk pengembangan dan pemanfaatan fenotip throughput tinggi dan analisis data besar pada peternakan. Depan. Genet. 10:1197.https://doi.org/10.3389/fgene . 2019.01197.

Ladd-Acosta, C., dan MD Fallin. 2016. Peran epigenetika dalam epidemiologi genetik dan lingkungan. Epigenomik 8:271–283. https://doi.org/10.2217/epi.15.102.

Lafontaine, S. 2022. Angka tambahan: Perbandingan hasil ternak berasal dari IVF, MOET, dan AI untuk produksi susu dan sifat kesuburan. Borealis, V1.https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC.

Lafontaine, S., R. Labrecque, JM Palomino, P. Blondin, dan M.-A.Tuan. 2020. Demetilasi gen tercetak spesifik terkait dengan usia donor oosit dan kondisi kultur pada embrio sapi yang dinilai pada hari ke 7 dan 12 pasca inseminasi. Teriogenologi 158:321–330.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09 . 027.

Liu, L., Y. Li, dan TO Tollefsbol. 2008. Interaksi gen-lingkungan tions dan dasar epigenetik penyakit manusia. Saat ini. Masalah mol. biologi. 10:25–36.

Mahsoudi, B., A. Li, dan C. O'Neill. 2007. Penilaian jangka panjang dan konsekuensi transgenerasi dari mengganggu perkembangan embrio praimplantasi pada tikus. biologi. mereproduksi. 77:889–896. https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057885.

Mueller, ML, dan AL Van Eenennaam. 2022. Kekuatan sinergis seleksi genom, teknologi reproduksi berbantuan, dan pengeditan gen untuk mendorong perbaikan genetik ternak. CABI Pertanian. biosci. 3:13.https://doi.org/10.1186/s43170-022-00080-z.

Mundim, TC, AF Ramos, R. Sartori, MA Dode, EO Melo, LF Gomes, R. Rumpf, dan MM Franco. 2009. Perubahan profil ekspresi gen embrio sapi yang diproduksi secara in vitro, melalui ovulasi alami, atau superstimulasi hormonal. Genet. mol. Res. 8:1398–1407.https://doi.org/10.4238/vol8-4gmr646. Novakovic, B., S. Lewis, J. Halliday, J.Kennedy, DP Burgner, A. Czajko, B. Kim, A. Sexton-Oates, M. Juonala, K. Hammarberg, DJ Amor, LW Doyle, S. Ranganathan, L. Welsh, M. Cheung, J. McBain, R. McLachlan, dan R. Saffery. 2019. Teknologi reproduksi berbantuan dikaitkan dengan variasi epigenetik terbatas saat lahir dan sebagian besar hilang saat dewasa. Nat. Komunitas. 10:3922. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11929-9.

Oh, SJ, SP Gong, ST Lee, EJ Lee, dan JM Lim. 2007. Cahaya intensitas dan panjang gelombang selama manipulasi embrio merupakan faktor penting untuk menjaga kelangsungan hidup embrio praimplantasi secara in vitro. Subur. Steril. 88:1150–1157.https://doi.org/10.1016/j . fertnstert.2007.01.036.

Ottosen, LDM, J. Hindkjær, dan J. Ingerslev. 2007. Paparan cahaya sel telur dan embrio praimplantasi selama prosedur ART. J.Membantu. mereproduksi. Genet. 24:99–103.https://doi.org/10.1007/s10815-006-9081-x.

Penova-Veselinovic, B., PE Melton, RC Huang, JL Yovich, P. Burton, LA Wijs, dan RJ Hart. 2021. Pola metilasi DNA dalam darah lengkap remaja yang lahir dari teknologi reproduksi berbantuan tidak berbeda dengan remaja yang lahir dari konsepsi alami. Bersenandung. mereproduksi. 36:2035–2049.https://doi.org/10.1093/humrep/deab078.

Rérat, M., Y. Zbinden, R. Saner, H. Hammon, dan JW Blum. 2005. Produksi embrio in vitro: Kinerja pertumbuhan, efisiensi pakan, dan status hematologi, metabolisme, dan endokrin pada anak sapi. J. Ilmu Susu. 88:2579–2593.https://doi.org/10.3168/jds.S0022 - 0302(05)72934-9.

Simopoulou, M., K. Sfakianoudis, A. Rapani, P. Giannelou, G. Anifandis, S. Bolaris, A. Pantou, M. Lambropoulou, A. Pappas, E. Deligeoroglou, K. Pantos, dan M. Koutsilieris. 2018. Pertimbangan mengenai kondisi kultur embrio: Dari media hingga epigenetika. Di Vivo 32:451–460.https://doi.org/10.21873/invivo.11261. Siqueira, LG, MVG Silva, JC Panetto, dan JH Viana. 2019. Konsekuensi teknologi reproduksi berbantuan terhadap fungsi keturunan pada sapi. mereproduksi. Subur. Dev. 32:82.https://doi.org/10 . 1071/RD19278.

Siqueira, LGB, S. Dikmen, MS Ortega, dan PJ Hansen. 2017. Fenotip sapi perah pascakelahiran diubah oleh produksi embrio in vitro menggunakan semen yang disortir X terbalik. J. Ilmu Susu. 100:5899–5908.https://doi.org/10.3168/jds.2016-12539.

Sirard, MA, FX Grand, R. Labrecque, C. Vigneault, dan P. Blonkeriuhan. 2018. Simposium Reproduksi Tiga Tahunan ASAS-SSR: Pemanfaatan dinamika folikuler siklus alami untuk meningkatkan kualitas oosit pada sapi perah dan dara. J.Anim. Sains.https://doi.org/10.1093/jas/sky050.

Skiles, WM, A. Kester, JH Pryor, ME Westhusin, MC Golding, dan CR Panjang. 2018. Perubahan yang diinduksi oksigen dalam ekspresi enzim pengubah kromatin dan regulasi transkripsi gen yang dicetak. Ekspres Gen. Pola 28:1–11.https: //doi.org/10.1016/j.gep.2018.01.001.

Urrego, R., N. Rodriguez-Osorio, dan H. Niemann. 2014. Epigenetik kelainan dan perubahan ekspresi gen setelah penggunaan Teknologi Reproduksi Berbantuan pada sapi domestik. Epigenetika 9:803–815. https://doi.org/10.4161/epi.28711.

Valenzuela-Alcaraz, B., F. Crispi, B. Bijnens, M. Cruz-Lemini, M. Creus, M. Sitges, J. Bartrons, S. Civico, J. Balasch, dan E. Gratacós. 2013. Teknologi reproduksi berbantuan dikaitkan dengan remodeling kardiovaskular di dalam rahim yang berlanjut setelah kelahiran. Sirkulasi 128:1442–1450.https://doi.org/10.1161/ CIRCULATIONAHA.113.002428.

van Wagtendonk-de Leeuw, AM 2006. Pengambilan sel telur dan di viproduksi tro pada sapi setelah digunakan dalam beberapa generasi: Status tahun 2005. Teriogenologi 65:914–925.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.007.

Viziack, MP 2020. Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE dan FIV) tidak menghasilkan produk dan reproduksi hasil

raça Holandesa. Tesis MS/PhD. Departemen Reproduksi Hewan, Universidade de São Paulo, Brasil.

Wilson, JM, JD Williams, KR Bondioli, CR Looney, ME Westhusin, dan DF McCalla. 1995. Perbandingan bobot lahir dan ciri pertumbuhan pedet sapi yang dihasilkan melalui transfer inti (kloning), transfer embrio dan perkawinan alami. animasi. mereproduksi. Sains. 38:73–83.https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01353 - N.

Wu, C., dan M.-A. Tuan. 2020. Efek orang tua pada program epigenetik gramming dalam gamet dan embrio sapi perah. Depan. Genet. 11:557846.https://doi.org/10.3389/fgene.2020.557846. Muda, LE, K. Fernandes, TG McEvoy, SC Butterwith, CG Gutierrez, C. Carolan, PJ Broadbent, JJ Robinson, I. Wilmut, dan KD Sinclair. 2001. Perubahan epigenetik pada IGF2R dikaitkan dengan disebabkan oleh pertumbuhan janin yang berlebihan setelah kultur embrio domba. Nat. Genet. 27:153–154.https://doi.org/10.1038/84769.

Zandstra, H., APA van Montfoort, JCM Dumoulin, LJI Zimikan duyung jantan, dan RNH Touwslager. 2020. Peningkatan tekanan darah dan gangguan fungsi endotel setelah percepatan pertumbuhan pada anak IVF/ICSI. Bersenandung. mereproduksi. Buka 2020:hoz037.https://doi . org/10.1093/hropen/hoz037.

ORCIDA

Simon Lafontaine https://orcid.org/0000-0002-2159-3066
Marc-André Sirard https://orcid.org/0000-0001-8667-6682

J. Ilmu Susu. TBC https://doi.org/10.3168/jds.2023-24199

© TBC, Para Penulis. Diterbitkan oleh Elsevier Inc. dan Fass Inc. atas nama American Dairy Science Association®. Ini adalah artikel akses terbuka di bawah lisensi CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Perubahan transkriptomik awal pada darah tepi 7 hari pasca transfer embrio pada sapi perah

A.Strangstalien,[1] CU Braz,[2] A.Miyamoto,[3] M. Marey, 34 dan H. Khatib1*

[1]Departemen Ilmu Hewan dan Susu, Universitas Wisconsin-Madison, 1675 Observatory Dr., Madison, WI 53706, AS.
[2]Departemen Ilmu Hewan, Universitas Illinois di Urbana-Champaign, 1207 W. Gregory Dr. Urbana, IL 61801, AS.
[3]Pusat Penelitian Agromedis Global, Universitas Pertanian & Kedokteran Hewan Obihiro, Obihiro 080-8555, Jepang.
[4]Departemen Theriogenology, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Damanhour, Behera, 22511, Mesir

ABSTRAK

Tujuan umum industri susu adalah memperpendek interval beranak untuk mendapatkan beberapa manfaat yang terkait dengan peningkatan kesuburan. Deteksi kebuntingan dini sangat penting untuk memperpendek interval ini, sehingga memungkinkan dilakukannya reinseminasi segera pada sapi yang gagal bunting setelah layanan pertama. Saat ini, industri tidak mempunyai metode untuk memprediksi kehamilan secara akurat dalam 3 minggu pertama. Polipeptida sitokin interferon-tau (IFNT) adalah sinyal utama untuk mengenali kebuntingan ibu pada hewan ruminansia. Ketika IFNT dilepaskan dari konseptus awal, ia memulai serangkaian efek, termasuk peningkatan regulasi gen yang distimulasi interferon (ISGs). Ekspresi ISG dapat dideteksi pada darah tepi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi perubahan transkriptomik perifer, termasuk ISG, pada awal hari ke 7 pasca transfer embrio. Sebanyak 170 ekor sapi dara Holstein menerima embrio yang diproduksi secara in vitro. Darah utuh dikumpulkan dari sapi dara ini dalam waktu 24 jam setelah transfer embrio (hari ke 0), hari ke 7, dan hari ke 14 setelah transfer embrio. Sapi dara dibagi menjadi 2 kelompok yaitu bunting dan tidak bunting berdasarkan diagnosis kebuntingan pada hari ke 28 melalui USG. Total RNA diekstraksi dari darah tepi sapi dara bunting dan tidak bunting, dikumpulkan dan diurutkan. Analisis ekspresi pada sapi dara hari ke 7 menghasilkan 13 gen yang diekspresikan berbeda secara signifikan, sebagian besar terkait dengan imunitas bawaan. Analisis ekspresi diferensial yang membandingkan sapi dara bunting pada hari ke 0 dengan sapi dara yang sama pada hari ke 14 menunjukkan 51 gen yang diekspresikan berbeda secara signifikan. Delapan gen selanjutnya dikuantifikasi melalui RT-qPCR untuk validasi biologis. Pada hari ke 7 pasca transfer embrio, transkripsi mRNA*EDN1*,*CXCL3*,*CCL4*, Dan *IL1A*secara signifikan diregulasi pada sapi dara bunting (n = 14) dibandingkan dengan sapi dara tidak bunting (n = 14), dengan perubahan lipatan berturut-turut sebesar 8.10, 18.12, 29.60, dan 29.97. Sedangkan pada hari ke 14 pasca transfer embrio, dilakukan transkripsi mRNA*ISG15*,*MX2*,*OASY1*, Dan*IFI6*secara signifikan diregulasi dalam darah sapi dara bunting (n = 14) dibandingkan dengan sapi dara yang sama pada hari ke 0, dengan perubahan lipatan masing-masing sebesar 5,09, 2,59, 3,89, dan 3,08. Temuan ini menunjukkan bahwa beberapa gen terkait kekebalan dan ISG diaktifkan selama 2 minggu pertama setelah transfer embrio, yang mungkin menjelaskan bagaimana sistem kekebalan ibu mengakomodasi konsepsi alogenik. Untuk menyelidiki lebih lanjut potensi diagnostik gen-gen ini, penelitian di masa depan diperlukan untuk menganalisis spesifisitas dan sensitivitas biomarker ini untuk memprediksi kehamilan dini.

Kata kunci: transfer embrio, transkriptomik, prediksi kehamilan, interferon-stimulated gen, ekspresi gen

PERKENALAN

Dalam industri susu, deteksi dini sapi yang gagal bunting setelah layanan pertama dan inseminasi ulang yang cepat sangat penting untuk meminimalkan hari-hari terbuka, yang memberikan beberapa manfaat ekonomi seperti peningkatan produksi susu dan jumlah anak sapi, serta mengurangi pembiakan. biaya dan tingkat pemusnahan (Balhara et al., 2013; Temesgen et al., 2022). Ada beberapa metode deteksi kehamilan langsung dan invasif, seperti USG dan USG doppler (Pohler et al., 2016), dan metode tidak langsung dan non-invasif lainnya, seperti glikoprotein terkait kehamilan (**PAG**) dan faktor praimplantasi (**PIF**) (Zoli dkk., 1992; Gajewski dkk., 2009; Ramu dkk., 2013; Wallace dkk., 2015; Wonfor dkk., 2020). USG, USG doppler, PAGs, dan PIF masing-masing dapat mendeteksi kehamilan pada hari ke 28, 25, 24, dan 20 kehamilan (Balhara et al., 2013; Ramu et al., 2013; Pohler et al., 2016; Filho et al., 2020). Namun, metode yang dapat diandalkan untuk memprediksi hasil kehamilan secara akurat dalam 3 minggu pertama masih belum ada. Menyelidiki interaksi embrio-ibu secara rinci

Diterima 16 September 2023.
Diterima 12 November 2023.
* Penulis koresponden: Hasan Khatib, Department of Animal and Dairy Sciences, 1675 Observatory Drive, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, USA, Tel.: (608) 263-3484, Email: hkhatib@wisc.edu

mungkin merupakan pendekatan yang menjanjikan untuk mengembangkan biomarker spesifik untuk kebuntingan awal pada sapi.

Pengenalan ibu dan pembentukan kehamilan memerlukan persilangan yang tepat antara embrio awal dan kekebalan bawaan ibu baik secara lokal pada antarmuka embrio-ibu (Talukder et al., 2020) atau secara sistemik pada sel kekebalan yang bersirkulasi untuk penerimaan uterus dan toleransi embrio (Oliveira et al. ., 2012;Gifford dkk., 2019). Hormon polipeptida interferon-tau (**JIKA**) merupakan mediator utama pengenalan kehamilan pada hewan ruminansia oleh ibu (Hansen et al., 2017). Ini disekresikan dari trofektoderm mononuklear dari konseptus sekitar hari ke 8, memuncak pada hari ke 20 pasca inseminasi buatan (**AI**) (Hirayama dkk., 2014). IFNT secara khusus mengontrol mekanisme luteotropik dan kekebalan tubuh, sehingga memungkinkan implantasi embrio berhasil (Kowalczyk et al., 2021). Kerjanya pada endometrium uterus untuk menghambat pelepasan prostaglandin F2A dari denyut uterus (**PGF2A**), suatu penghambatan yang penting untuk mempertahankan korpus luteum (Basavaraja et al., 2021). Setelah dilepaskan oleh konseptus, IFNT berikatan dengan reseptor interferon α dan β (**IFNR**) subunit 1 dan 2, memulai serangkaian efek, khususnya melalui jalur interferon tipe-1 klasik (Toji et al., 2017; Basavaraja et al., 2019; Basavaraja et al., 2021).

IFNT juga memicu gen yang distimulasi interferon (**ISG**) dalam berbagai jenis jaringan termasuk endometrium, sel luteal, hati, dan dalam darah tepi, termasuk sel mononuklear darah tepi (**PBMC**) dan neutrofil polimorfonuklear darah tepi (**PMN**) (Rani dkk., 2007; Green dkk., 2010; Bridi dkk., 2018; Rashid dkk., 2018; Kasimanickam dkk., 2020; Basavaraja dkk., 2021;). ISG klasik mencakup pengubah mirip 15-ubiquitin (**ISG15**), Dinamin MX seperti GTPase 1 (**MX1**), Dinamin MX seperti GTPase 2 (**MX2**), dan 2'-5'-oligoadenlat sintetase 1 (**OAS1**) (Toji dkk., 2017). Ekspresi ISGs pada awal kebuntingan pada ruminansia menstimulasi hiperplasia kelenjar endometrium, remodeling stroma, dan perkembangan pembuluh darah uterus (Bazer, 2013) dan menginduksi keadaan toleransi imun embrio yang sangat diperlukan untuk keberhasilan implantasi dan pemeliharaan kebuntingan (Mishra et al., 2018). Oleh karena itu, ekspresi perifer dari gen-gen ini berpotensi berfungsi sebagai biomarker awal kehamilan.

Beberapa penelitian telah menyelidiki perubahan transkriptomik darah tepi selama awal kehamilan. Telah dibuktikan bahwa ekspresi ISG klasik (ISG15, MX1, dan MX2) dalam sel imun yang bersirkulasi pada sapi bunting mengalami peningkatan regulasi dibandingkan dengan hewan tidak bunting pada usia kehamilan 21 tahun pada sapi Hitam Jepang yang ditransfer melalui embrio (Yoshino et al., 2023) . Selain itu, menganalisis profil transkriptomik sel imun perifer dari sapi bunting 21 d setelah transfer embrio terungkap bahwa lebih dari 600 gen diekspresikan secara berbeda antara sapi bunting dan tidak bunting (De Los Santos et al., 2023). Gen yang diekspresikan secara berbeda tersebut terkait dengan toleransi imun, angiogenesis, respons inflamasi, dan sekresi sitokin (De Los Santos et al., 2023). Namun, perubahan transkriptomik sebelumnya dalam sirkulasi sel imun yang terjadi dalam satu minggu setelah transfer embrio masih belum diselidiki. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi perubahan transkriptomik pada leukosit darah tepi secara substansial lebih awal, pada hari ke 7 dan 14 setelah transfer embrio. Kami berhipotesis bahwa gen yang berhubungan dengan kekebalan tubuh diekspresikan secara berbeda antara sapi dara bunting dan tidak bunting dan bahwa gen ini dapat memberikan wawasan tentang mekanisme yang mendorong toleransi imun terhadap embrio. Gen-gen tersebut berpotensi menjadi biomarker untuk memprediksi kehamilan dalam 2 minggu pertama setelah transfer embrio.

BAHAN DAN METODE

Pernyataan etika

Penelitian ini dikecualikan dari persetujuan Komite Perawatan dan Penggunaan Hewan Institusional karena hewan tidak ditangani di institusi kami. Hewan yang digunakan dalam pengambilan oosit dan transfer embrio dimiliki oleh ST Genetics, yang berlokasi di Wina, Wisconsin, dan Fond du Lac, Wisconsin.

Pengambilan Ovum (OPU)

Sapi dara Holstein superovulasi yang ditempatkan bersama dalam satu fasilitas digunakan sebagai donor oosit. Teknik pengambilan ovum (OPU), atau pengangkatan oosit secara transvaginal, dilakukan dengan mengarahkan probe ultrasonografi untuk mencari dan mengaspirasi folikel ovarium (Callesen et al., 1987; Pieterse et al., 1988; Pieterse et al., 1991) . OPU dilakukan oleh dokter hewan yang sama. Cairan folikel yang diaspirasi segera dicari oositnya.

Produksi Embrio In Vitro

Embrio dihasilkan melalui sistem fertilisasi in vitro (IVF) di ST Genetics dari Mei 2021 hingga Agustus 2021. Singkatnya, oosit disedot dari folikel sapi dara donor. Cairan yang diaspirasi dicari kompleks kumulus-oosit (COCs) segera setelah aspirasi dan dinilai sebagai layak atau tidak. Oosit yang layak dengan setidaknya satu lapisan sel kumulus dicuci dan ditempatkan ke dalam media pematangan yang dilapisi minyak mineral dengan kelompok yang dikelompokkan berdasarkan sapi donor. Setelah inkubasi 18-23 jam, COC dikeluarkan dan ditempatkan ke dalam wadah pupuk.

media tion. Di sana, kompleks dilucuti dari sel kumulus dengan pemipaan. Semen konvensional dibuat menggunakan PureSperm 40/80 (https://nidacon . com/ product/puresperm-40-80-2x20-ml/) metode dengan sedikit penyesuaian pada protokol. Sperma ditambahkan ke media pembuahan segar dengan oosit yang telah dikupas. Gamet diinkubasi bersama selama 8 jam. Zigot dugaan dicuci dalam media kultur, dipindahkan ke media kultur segar, dan dikultur hingga hari ke 7 perkembangan. Pada hari ke 7, embrio dinilai secara morfologis. Mereka yang berkembang ke tahap blastokista ditandai dengan diferensiasi yang nyata pada lapisan trofoblas luar dan massa sel dalam, serta blastokel yang menonjol. Mid-blastokista, blastokista yang mengembang, dan blastokista yang menetas dengan kualitas kualitas 1–2 (Bo dan Mapletoft, 2013) dipindahkan ke dalam sedotan sebagai persiapan untuk dipindahkan ke sapi dara penerima.

Pemindahan Embrio

Sapi penerima sinkronisasi estrus yang dipilih untuk transfer embrio adalah sapi dara Holstein (rata-rata berumur 2 tahun) yang ditempatkan di fasilitas yang sama. Embrio yang dihasilkan secara acak ditugaskan ke sapi penerima. Sebanyak 170 ekor sapi dara menerima embrio. Kehamilan dikonfirmasi pada hari ke 28 melalui USG. Sapi dara yang mengalami kehilangan embrio dini sebelum hari ke 28 dianggap tidak bunting.

Pengumpulan Darah

Dalam waktu 24 jam setelah transfer embrio, sampel darah dikumpulkan dari vena ekor (tulang ekor) dalam 9 mL tabung pengumpul darah EDTA. Pengumpulan ini dinotasikan sebagai Hari 0 (D0). Darah dikumpulkan dari sapi dara yang sama pada hari ke 7 (D7) dan 14 (D14) pasca transfer embrio. Sampel darah lengkap disentrifugasi pada 2.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C dalam waktu 24 jam setelah pengumpulan. Lapisan buffy coat yang dihasilkan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 mL segar. 500 µL RNA-Later (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) ditambahkan ke setiap buffy coat, dan sampel disimpan pada suhu −20 ° C hingga diproses lebih lanjut.

Ekstraksi RNA dan Pengumpulan RNA

Sampel buffy coat yang disimpan dalam RNA-Later dicairkan pada suhu kamar, kemudian diencerkan 1:1 dalam PBS sebelum ekstraksi RNA (500 µL buffy coat: 500 µL PBS). Sampel yang diencerkan 1:1 diputar pada 5.000 xg selama 5 menit pada suhu kamar untuk membuat pelet sel. Supernatan dibuang, dan pelet disuspensikan kembali dalam 1 mL TRIzol, dicampur dengan pemipaan, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Lalu, 200 µL kloroform ditambahkan ke setiap sampel dan dicampur dengan cara dikocok kuat-kuat. Sampel diinkubasi pada suhu kamar selama 3 menit dan diputar pada 12.000 xg pada suhu 4°C selama 15 menit. Setelah pemisahan fase ini, fase air bagian atas dipindahkan ke tabung mikrosentrifugasi 1,5 mL yang baru. Setelah itu, 500 µL isopropanol ditambahkan, dan sampel kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama 10 menit. Sampel diputar pada 12.000 xg pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan 1 mL etanol 75% tingkat molekuler yang baru dibuat ditambahkan. Sampel diputar pada 7.500 xg pada suhu 4°C selama 5 menit dan supernatan dibuang. Sampel dikeringkan pada suhu kamar selama 5 sampai 10 menit untuk menghilangkan kelebihan etanol. RNA diresuspensi dalam 20 µL air bebas nuklease (NFW).

Konsentrasi RNA yang diekstraksi diukur menggunakan spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware). Sampel RNA dinormalisasi menjadi 60 ng/µL menggunakan NFW dan dikumpulkan untuk pengurutan RNA. Sampel RNA yang dikumpulkan menjadi sasaran pengobatan DNase menggunakan Ambion DNA-*bebas*Pengobatan DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Sampel dikumpulkan berdasarkan hari pengambilan darah dan hasil kehamilan. Sampel juga dikumpulkan berdasarkan indukan dari embrio yang ditransfer untuk memastikan keterwakilan yang setara dari indukan dalam kelompok hamil dan tidak hamil. Setiap kelompok berisi 6 hingga 7 sampel RNA individu dari sapi dara berbeda. Sebanyak 64 ekor sapi dara dimasukkan dalam kelompok pengurutan (Gambar Tambahan 1). Sebanyak 30 kelompok diurutkan, dimana 15 mewakili sapi dara bunting dan 15 mewakili sapi dara tidak bunting. Dari 15 pool sapi dara bunting, 5 pool merupakan koleksi D0, 5 pool D7, dan 5 pool D14. Begitu pula dari 15 kolam yang berasal dari sapi dara tidak bunting, 5 kolam merupakan koleksi D0, 5 kolam koleksi D7, dan 5 kolam koleksi D14. Sapi jantan yang digunakan untuk membuahi embrio untuk dipindahkan sama-sama dimasukkan ke dalam kelompok bunting dan tidak bunting. Kumpulan RNA dari sapi dara bunting dilambangkan sebagai PR, sedangkan kumpulan sampel RNA dari sapi dara tidak bunting dilambangkan sebagai NP.

Urutan Illumina dan Analisis Data

Sampel RNA gabungan yang diberi perlakuan DNase diurutkan oleh Admera Health (South Plainfield, NJ). Sebelum persiapan perpustakaan, kuantitas RNA diperiksa menggunakan uji Qubit RNA HS (Thermo Fisher Scientific). Kualitas RNA dianalisis menggunakan Bioanalyzer 2100 Eukaryote Total RNA Nano (Agilent Technologies, CA). Persiapan perpustakaan RNA dilakukan menggunakan Quant-seq 3'Kit RNaseq FWD (Lexogen, Wina, Austria). Konsentrasi dan kualitas perpustakaan diperiksa

menggunakan Tapestation High Sensitivity D1000 Assay (Agilent Technologies). Jumlah integritas RNA (RIN) dari semua kelompok adalah dari 7,4 hingga 9,4.

Pengurutan dilakukan dengan Illumina HiSeq X, menghasilkan 100 pembacaan satu ujung untuk menghasilkan 30 juta pembacaan satu ujung per sampel. Untuk setiap sampel, FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) dan Trimmomatic (Bolger et al., 2014) digunakan untuk memeriksa kualitas pembacaan mentah dan untuk memangkas urutan adaptor dan pembacaan berkualitas rendah. Bacaan yang dipangkas kemudian diselaraskan dengan genom referensi sapi (Btau 5.0.1) menggunakan STAR (Dobin et al., 2013), termasuk opsi "–quantMode GeneCounts" untuk memperkirakan jumlah gen. Hanya gen yang diekspresikan dengan setidaknya 15 jumlah di lebih dari 5 sampel yang dipertimbangkan untuk setiap analisis. Paket R "edgeR" digunakan untuk menormalkan jumlah gen berdasarkan metode trimmed mean of M-values (TMM) (Robinson et al., 2010). Analisis ekspresi diferensial dilakukan berdasarkan model linier umum binomial negatif, termasuk kelompok bapak sebagai faktor pemblokiran, menggunakan paket edgeR (Robinson et al., 2010). Uji statistik dikoreksi untuk beberapa pengujian, sehingga hanya gen dengan tingkat penemuan palsu (FDR) kurang dari 0,05 yang dianggap signifikan (Benjamini dan Hochberg, 1995). Perbedaan lipatan dalam ekspresi dihitung dengan cara berikut: Perubahan Lipat = $2^{\log_2 FC}$, catatan$_2$FC = catatan$_2$lipat perubahan antar kelompok. Kumpulan D0 dan D14 diurutkan bersama dalam proses pengurutan yang sama. Namun, kumpulan D7 diurutkan dalam rangkaian pengurutan yang berbeda, menghilangkan peluang untuk analisis ekspresi diferensial D0 dan D7 karena sumber variasi, dari data pengurutan atau dari perbedaan biologis, tidak dapat ditentukan.

Validasi RNA-Seq Menggunakan Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

Sampel RNA individu, tidak termasuk dalam kelompok pengurutan, digunakan untuk validasi biologis melalui RT-qPCR. RNA yang diekstraksi ditranskripsi terbalik menjadi cDNA oleh Kit Sintesis cDNA iScript (Bio-Rad, Hercules, CA). Volume reaksi adalah 10 µL. Reaksi reverse transkriptase-PCR diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, 46°C selama 20 menit, dan kemudian pada suhu 95°C selama 1 menit.

Analisis ekspresi gen dilakukan menggunakan iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad). cDNA diencerkan 1:6 dengan NFW, kemudian dikombinasikan dengan supermix iTaq Universal SYBR Green dan primer maju dan mundur (Tabel 1). Primer maju dan mundur spesifik diperoleh dari Teknologi DNA Terpadu (IDT, Coralville, IA). Reaksi RT-qPCR dilakukan di mesin PCR real-time Bio-Rad iCycler dengan kondisi siklus sebagai berikut: inkubasi 95°C selama 30 detik diikuti dengan 40 siklus 95°C selama 5 detik dan 59°C selama 30 detik. , diakhiri dengan inkubasi pada suhu 65°C selama 5 detik dan inkubasi pada suhu 95°C selama 5 detik.

Analisis Statistik RT-qPCR

Untuk mengevaluasi ekspresi RNA, nilai ambang siklus (Ct) dinormalisasi ke gen β-aktin rumah tangga endogen. Kontrol gen β-aktin dipilih menggunakan NormFinder, yang menghitung stabilitas ekspresi. Rata-rata dan kisaran perubahan lipatan untuk setiap RNA dihitung sebagai $2^{-\Delta\Delta CT}$menggunakan estimasi nilai ΔΔCt ± standard error mengikuti angka $2^{-\Delta\Delta CT}$ metode oleh Livak dan Schmittgen (2001). Untuk membandingkan tingkat ekspresi gen sapi dara bunting dan tidak bunting pada D7, data dianalisis dengan a *T*-uji nilai ΔCt untuk setiap gen. Untuk membandingkan tingkat ekspresi gen koleksi D0 dan D14 dari sapi dara yang sama, data dianalisis secara berpasangan *T*-uji nilai ΔCt untuk setiap gen.

HASIL

Analisis Data RNA-Seq

Analisis ekspresi diferensial dilakukan dalam 5 perbandingan berbeda (Tabel 2). Analisis 1 dibandingkan

Tabel 1. Urutan primer RT-qPCR dari gen yang diekspresikan secara berbeda

Gen	Primer Maju (5'-3')	Primer Terbalik (5'-3')	Referensi
B-aktin*	CTGGACTTCGAGCAGGAGAT	GGATGTCGACGTCACACTTC	Gifford dkk. (2007)
IFI6	CTCCTCCAAGATACGGTGACAA	TTTCGTCTTCCTCCTGCAG	Peñagaricano dkk. (2013)
ISG15	GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT	ACCTCCCTGCTGTCAAGGT	Gifford dkk. (2007)
MX2	CTTCAGAGACGCCTCAGTCG	TGAAGCAGCCAGGAATAGTG	Gifford dkk. (2007)
OAS1Y	ACCCTCTCCAGGAATCCAGT	GATTCTGGTCCCAGGTCTGA	Hijau dkk. (2010)
IL1A	GCCTTCAATAACTGTGGAACCAAT	GTATATTTCAGGCTTGGTGAAAGGA	Rutigliano dkk. (2022)
CCL4	AGCTGTGGTATTCCAGACCAA	TCAAGGTCATCCACGTACTCC	Magee dkk. (2014)
CXCL3	GACAGTTCCTGAAAAGTGGT	ATAGTCCAGCACATCAAGTC	Islam dkk. (2020)
EDN1	TCTGGACATCTCTGGGTCA	TTTGGTTGTTCCAGGCTTTC	Yamamoto dkk. (2016)

* Pengendalian internal rumah tangga.

Meja 2. Perbandingan ekspresi diferensial gen (DE) leukosit darah tepi pada pengambilan darah d 0 (D0), d 7 (D7), dan d 14 (D14)

Analisis	Perbandingan	Jumlah Gen*	gen DE**
1	NP D7 vs PR D7	11.413	13
2	PR D0 vs. PR D14	11.749	51
3	NP D14 vs. PR D14	11.709	0
4	NP D0 vs. PR D0	11.739	0
5	NP D0 vs NP D14	11.674	26

NP = tidak hamil, PR = hamil. *Jumlah total gen yang dianalisis.
* * FDR < 5%.

sapi dara yang tidak bunting dan bunting pada D7, menghasilkan 13 gen yang diekspresikan secara berbeda (Tabel Tambahan 1). Analisis 2 membandingkan sapi dara bunting pada D0 dengan sapi dara yang sama pada D14, di mana 51 gen diekspresikan berbeda secara signifikan (Tabel Tambahan 2). Analisis ekspresi diferensial 3 membandingkan hewan yang tidak hamil dan hewan bunting pada D14, menunjukkan tidak ada gen yang diekspresikan secara berbeda. Analisis ekspresi diferensial 4 membandingkan kelompok tidak hamil dan kelompok hamil pada D0 atau hari transfer embrio. Ini mengungkapkan tidak ada gen yang diekspresikan secara berbeda. Perbandingan ini berfungsi sebagai kontrol untuk memastikan tidak ada perbedaan ekspresi yang signifikan antara 2 kelompok sapi dara pada hari transfer embrio. Analisis ekspresi diferensial 5 membandingkan hewan yang tidak hamil pada D0 dengan D14, mengungkapkan 26 gen yang diekspresikan secara berbeda (Tabel Tambahan 3). Analisis ini juga bertindak sebagai kontrol untuk mengurangi kemungkinan mengidentifikasi hasil positif palsu atau gen yang mungkin diekspresikan secara berbeda pada D14 yang tidak terkait dengan kehamilan.

Validasi Ekspresi Gen

Dari gen-gen yang diekspresikan secara berbeda yang diidentifikasi dalam analisis 1 dan 2, 8 gen dipilih untuk kuantifikasi dan validasi lebih lanjut. Gen-gen ini dipilih berdasarkan FDR, perbedaan ekspresi, dan relevansinya dengan respon imun. Gen yang dipilih dari analisis satu meliputi ligan kemokin motif CC 4 (*CCL4*), Interleukin 1 A (*IL1A*), Kemokin (CXC motif) ligan 3 (*CXCL3*), dan Ekspresi Endotelin 1 (*EDN1*) (Tabel 3). Gen yang dipilih dari analisis 2 termasuk protein yang dapat diinduksi Interferon α 6 (*IFI6*), GTPase 2 mirip MX Dynamin (*MX2*), 2'-5'-Oligoadenilat sintetase 1 (*OAS1Y*), dan pengubah mirip ubiquitin gen 15 yang distimulasi interferon (*ISG15*) (Tabel 4).

Untuk memvalidasi gen yang diekspresikan secara berbeda yang diperoleh melalui pengurutan RNA, 8 gen yang dipilih diuji lebih lanjut melalui RT-qPCR dalam sampel baru yang tidak termasuk dalam kumpulan pengurutan. Untuk perbandingan sapi dara bunting dan tidak bunting pada D7, RNA dari 28 individu sapi dara (14 bunting dan 14 tidak bunting) dianalisis (Gambar 1A). *CCL4* Ekspresi ditemukan meningkat pada 13 dari 14 sapi dara yang bunting dibandingkan dengan sapi dara yang tidak bunting, dengan rata-rata perubahan lipatan sebesar 29,60 (P<0,001). *IL1A* Ekspresi ini diregulasi pada 12 dari 14 sapi dara yang bunting dibandingkan dengan sapi dara yang tidak bunting, dengan rata-rata perubahan lipatan sebesar 29,97 (P<0,001). Ekspresi dari *CXCL3* diregulasi pada 14 ekor sapi dara bunting dibandingkan dengan sapi dara tidak bunting dengan rata-rata perubahan lipatan sebesar 18,12 (P=0,002). Untuk *EDN1*, ekspresi diregulasi pada 11 dari 14 sapi dara bunting dibandingkan dengan sapi dara tidak bunting dengan rata-rata perubahan lipatan sebesar 8,10 (P= 0,043). Dengan demikian, hasil RT-qPCR dari gen-gen ini melaporkan peningkatan regulasi pada hewan bunting, sehingga mendukung hasil pengurutan RNA.

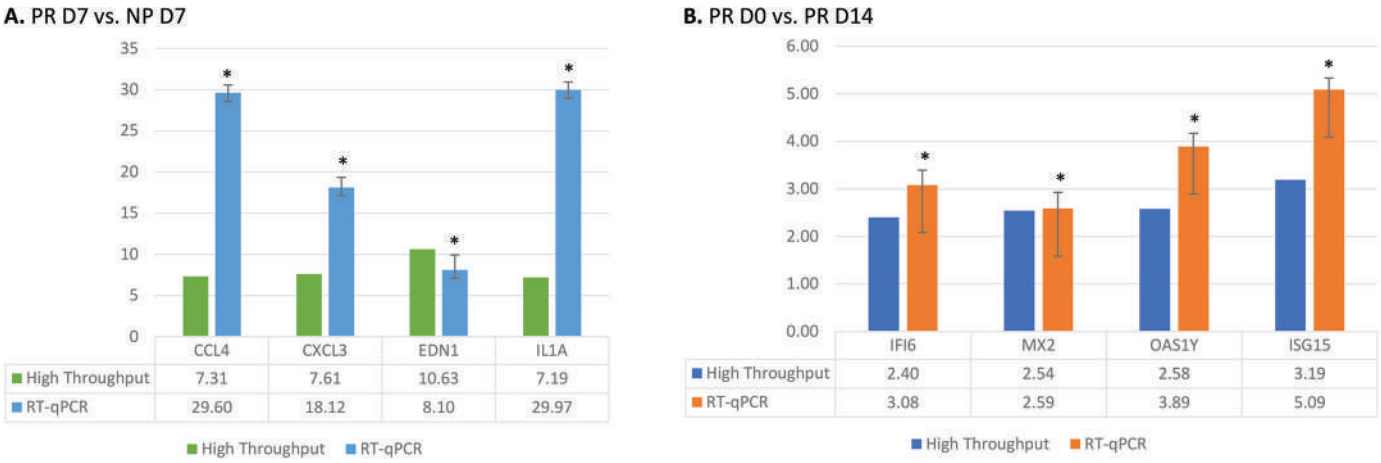
Untuk perbandingan sapi dara bunting pada koleksi D0 dibandingkan dengan sapi dara yang sama pada D14 setelah transfer embrio, dilakukan analisis RNA dari 14 ekor sapi dara (Gambar 1B). *IFI6* diregulasi secara signifikan pada 13 dari 14 sapi dara pada D14 dibandingkan dengan D0 dengan rata-rata perubahan lipatan sebesar 3,08 (P=0,002). *MX2* ekspresi secara signifikan diregulasi pada 13 dari 14 sapi dara pada D14 dibandingkan dengan D0 dengan rata-rata perubahan lipatan sebesar 2,59 (P<0,001). *OAS1Y* ekspresi secara signifikan diregulasi pada 14 sapi dara pada D14 dibandingkan dengan D0 dengan rata-rata perubahan lipatan sebesar 3,89 (P<0,001), dan *ISG15* ekspresi secara signifikan diregulasi pada 14 ekor sapi dara pada D14 dibandingkan dengan D0 dengan rata-rata perubahan lipatan sebesar 5,09 (P<0,001). RT-qPCR

Tabel 3. Analisis ekspresi diferensial data RNA-seq membandingkan gen PR D7 dan NP D7 yang dipilih untuk validasi lebih lanjut[1]

	Rata-rata pembacaan rata-rata yang dinormalisasi ± SD				
	PR Hari 7	NP Hari 7	Lipat Perbedaan Ekspresi	Nilai-P	FDR
CCL4	51,01 ± 20,53	6,70 ± 1,65	7.31	<0,001	<0,001
IL1A	24,52 ± 20,08	2,66 ± 0,46	7.19	<0,001	0,006
CXCL3	77,40 ± 30,62	10,68 ± 6,25	7.61	<0,001	0,006
EDN1	5,25 ± 2,87	0,44 ± 0,24	10.63	<0,001	0,046

PR = hamil, NP = tidak hamil, D7 = d 7 pengambilan darah.

1 Data sekuensing RNA dari kumpulan RNA yang diekstraksi dari leukosit darah tepi sapi dara bunting dan tidak bunting pada hari ketujuh setelah transfer embrio.



Gambar 1. Perubahan lipatan komparatif (rata-rata ± SEM) dari sekuensing RNA throughput tinggi dan RT-qPCR. * menunjukkan signifikansi (*P*<0,05) dari perubahan lipatan yang dihitung RT-qPCR. A. PR D7 (n = 14) dan NP D7 (n = 14) perubahan lipatan komparatif. B. PR D0 (n = 14) dan PR D14 (n = 14) perbandingan perubahan lipatan.

hasil keempat gen mendukung hasil sekuensing RNA untuk sapi dara D14.

DISKUSI

Selama 2 minggu pertama setelah transfer embrio, blastokista sapi menetas dan keluar dari zona pelusida, mengalami pertumbuhan trofektoderm, pemanjangan, dan ditanamkan ke dalam jaringan endometrium menjelang akhir minggu kedua setelah transfer embrio (Thomas, 2013; Brooks et al. , 2014; Spencer dkk., 2016). Penelitian in vivo kami mengkarakterisasi profil transkriptomik leukosit perifer sapi dara bunting selama 2 minggu pertama setelah transfer embrio. Hasil baru kami menunjukkan bahwa beberapa gen diekspresikan secara berbeda dalam leukosit perifer sapi dara bunting sejak D7 dan D14 pasca transfer embrio. Sebagian besar gen yang diekspresikan secara berbeda tersebut adalah gen yang berhubungan dengan kekebalan tubuh dan ISG. Temuan ini menunjukkan bahwa embrio sapi berinteraksi dengan sel imun yang bersirkulasi sejak H7 setelah transfer embrio untuk menginduksi suatu keadaan. toleransi penting untuk perkembangan dan kelangsungan hidup embrio.

Hasil kami menunjukkan hal itu*CCL4*,*IL1A, CXCL3*, Dan *EDN1*, dan ekspresi mRNA secara signifikan diregulasi pada sapi dara bunting pada D7 pasca transfer embrio. *CCL4*Dan *CXCL3*adalah kemokin yang mengatur beberapa fungsi biologis, termasuk angiogenesis, embriogenesis, dan inisiasi respon imun (Borroni et al., 2008). Mereka memainkan peran penting dalam komunikasi pada antarmuka konseptus-ibu, memungkinkan embrio alogenik untuk bertahan hidup dan akhirnya berimplantasi ke dalam endometrium (Borroni et al., 2008; Du et al., 2014; Zhang et al., 2022). Pada babi,*CCL4*sangat penting dalam mempersiapkan endometrium untuk kehamilan dengan mengaktifkan gen terkait implantasi dan merekrut makrofag ke tempat implantasi (Borroni et al., 2008; Du et al., 2014). Hal itu juga telah terbukti*CCL4*merangsang migrasi trofoblas selama implantasi (Hannan et al., 2006). *CXCL3*juga dilaporkan terkait dengan migrasi, invasi, dan proliferasi trofoblas (Gui et al., 2014; Wang et al., 2018). Penelitian telah menunjukkan bahwa keduanya*CCL4*Dan *CXCL3*ekspresi adalah

Tabel 4. Analisis ekspresi diferensial data RNA-seq membandingkan gen PR D0 dan PR 14 yang dipilih untuk validasi lebih lanjut[1]

	Rata-rata pembacaan rata-rata yang dinormalisasi ± SD				
	PR Hari 0	PR Hari 14	Lipat Perbedaan Ekspresi	Nilai-P	FDR
IFI6	84,77 ± 28,92	196,97 ± 31,83	2.40	<0,001	<0,001
MX2	12.00 ± 3.16	30,27 ± 6,11	2.54	<0,001	<0,001
OAS1Y	48,38 ± 14,52	121,48 ± 17,54	2.58	<0,001	<0,001
ISG15	18.20 ± 8.90	53,90 ± 8,63	3.19	<0,001	0,006

PR = hamil, D0 = d 0 pengambilan darah, D14 = d 14 pengambilan darah.

1 Data sekuensing RNA dari kumpulan RNA yang diekstraksi dari leukosit darah tepi sapi dara bunting pada hari ke 0 dan hari ke 14 setelah transfer embrio.

abnormal pada wanita dengan preeklamsia, yang menunjukkan pentingnya implantasi yang tepat (Gui et al., 2014; Garrido-Gomez et al., 2017; Wang et al., 2018; Ren et al., 2022). Interleukin IL1A adalah sitokin, pengatur kekebalan utama selama kehamilan, yang mengatur penerimaan uterus, implantasi, dan perkembangan janin (Dutta dan Sengupta, 2017; Malik dan Kanneganti, 2018). *EDN1*adalah peptida pleiotropik yang mengatur vaskularisasi dan pertumbuhan sel (Korth et al., 1999). Diketahui bahwa faktor inflamasi atau imun dalam sirkulasi ibu mengaktifkan endotel, sehingga meningkatkan ekspresi *EDN1*dalam darah tepi (George dan Granger, 2012; Galaviz-Hernandez et al., 2016).

Kemampuan sel imun yang bersirkulasi pada sapi dara bunting untuk mengekspresikan gen terkait imun pada D7 pasca transfer embrio (awal inisiasi penerimaan uterus terhadap implantasi; Brooks dkk., 2014), serta perannya dalam induksi yang disebutkan di atas implantasi menunjukkan bahwa sel-sel kekebalan yang bersirkulasi mengenali dan bereaksi terhadap jaringan kekebalan untuk memastikan embrio tertanam di dalam rahim. Selain itu, kurangnya ekspresi gen-gen ini dalam sirkulasi sel imun berpotensi menjadi sinyal awal kegagalan implantasi dan kematian embrio dini berikutnya. Namun, masih belum jelas bagaimana embrio kecil yang berada di dalam rahim dapat menginduksi respon imun sistemik dalam sel darah yang bersirkulasi selama minggu pertama setelah transfer embrio. Embrio sapi pra-penetasan telah terbukti menginduksi respons anti-inflamasi pada epitel endometrium dan sel imun lokal pada antarmuka embrio-ibu (Talukder et al., 2020; Rashid et al., 2018). Selain itu, sel imun, khususnya PMN, dapat memperkuat dan mentransfer sinyal embrio ke lingkungan ekstrauterin melalui mekanisme komunikasi sel ke sel (Fiorenza et al., 2021). Oleh karena itu, hasil kami menunjukkan bahwa kehadiran embrio memicu respons anti-inflamasi secara lokal di lingkungan rahim dan bahwa sel-sel kekebalan yang ada memperkuat dan mentransfer sinyal embrio ke dalam sirkulasi umum untuk mentoleransi embrio semi-alogenik ini.

Hingga minggu kedua pasca transfer embrio (D14), hasil kami menunjukkan hal itu*IFI6*,*MX2*,*OAS1Y,*Dan *ISG15*gen secara signifikan diregulasi pada sapi dara bunting dibandingkan dengan levelnya pada sapi dara yang sama pada D0. Khususnya, gen-gen ini juga tidak diregulasi secara signifikan pada sampel D14 hewan yang tidak hamil.*ISG15*,*MX2*, Dan*OAS1Y*dikenal sebagai ISG klasik, di mana IFNT berikatan dengan reseptor di epitel uterus, mengaktifkan jalur JAK-STAT, yang pada akhirnya mengarah pada ekspresi gen-gen ini (Platanias, 2005; Chaney et al., 2021). Embrio sapi D7 mengeluarkan IFNT dalam jumlah kecil ke dalam lumen uterus, yang memicu ekspresi ISG di epitel endometrium untuk toleransi embrio pada antarmuka embrio-ibu (Talukder dkk., 2020; Rasyid dkk., 2018). Kemudian, IFNT menginfiltrasi ke dalam sirkulasi selama periode pemanjangan konseptus (hari ke 12-15) dan mencapai puncak produksi sekitar hari ke 20 kehamilan (Hansen dkk., 2017), ketika efek nyata pada sel imun yang bersirkulasi telah dilaporkan (Green dkk. ., 2010; Rocha et al., 2020; Ferraz et al., 2021) sebagaimana dikonfirmasi dengan data penelitian ini. Demikian pula, Yoshino dkk. menemukan bahwa tingkat ekspresi *ISG15* Dan*MX2*leukosit darah tepi sapi bunting jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hewan tidak bunting pada H21 kebuntingan (Yoshino et al., 2020, 2023). Ferraz dkk. menemukan peningkatan ekspresi*ISG15*dalam PBMC sapi Holstein bunting pada D20 pasca AI (Ferraz et al., 2021).*OAS1*ekspresi juga telah dilaporkan meningkat selama hari ke 15 hingga 18 pada sapi dara bunting (Green et al., 2010).*IFI6*juga merupakan ISG yang berfungsi dalam imunomodulasi (Sajid et al., 2021; Villamayor et al., 2023). Sebelumnya telah diberitakan bahwa*IFI6*diregulasi dalam sirkulasi perifer wanita hamil (Wright et al., 2023). Selain itu, Rocha dkk. (2020) teridentifikasi *IFI6*ekspresi akan diregulasi secara signifikan dalam sel kekebalan sapi perifer (PBMC dan PMN) sejak H18 pasca-AI pada sapi dara. Sebelumnya, telah dilaporkan bahwa ISG diregulasi dalam PBMC dan PMN yang bersirkulasi sejak H7 kebuntingan pada sapi dengan banyak embrio (Talukder et al., 2019). Secara keseluruhan, tampaknya kemampuan embrio sapi untuk memicu respons imun dalam sirkulasi sel imun bergantung pada proliferasi embrio dan tingkat IFNT turunan embrio yang diinfiltrasi ke dalam sirkulasi umum.

Namun, analisis ekspresi diferensial kami 3 mengungkapkan bahwa ISG tidak diekspresikan secara berbeda pada sapi dara yang tidak bunting dibandingkan dengan sapi dara bunting pada D14 pasca transfer embrio. Demikian pula, Yoshino dkk. melaporkan tidak ada perbedaan ekspresi ISG pada sapi bunting pada D21 dibandingkan dengan sapi tidak bunting yang mengalami kematian embrio terlambat (Yoshino et al., 2020; Yoshino et al., 2023). Oleh karena itu, kami menyarankan bahwa analisis ekspresi ISG dalam sel darah pada D14 pasca transfer embrio berfungsi sebagai biomarker potensial untuk deteksi dini hewan yang gagal untuk hamil serta kemajuan relatif kehamilan pada hewan bunting.

Ini adalah penelitian pertama yang dilaporkan untuk mengkarakterisasi perubahan transkriptomik yang bersirkulasi paling cepat satu minggu setelah transfer embrio. Namun, salah satu keterbatasan penelitian ini adalah ketidakmampuan membandingkan koleksi D7 dengan koleksi D0 dan D14. Kemampuan untuk menganalisis perubahan transkriptomik terkait kehamilan dari sapi dara pada hari transfer embrio (D0) hingga satu minggu kemudian (D7) dapat memberikan informasi tambahan tentang bagaimana perubahan ekspresi gen leukosit yang bersirkulasi dalam minggu pertama perkembangan embrio pasca transfer.

KESIMPULAN

Studi ini memberikan bukti in vivo untuk perubahan transkriptomik pada leukosit yang bersirkulasi yang terjadi 1-2 minggu setelah transfer embrio pada sapi perah. Beberapa gen dan ISG yang berhubungan dengan kekebalan diaktifkan selama periode ini, yang mungkin memberikan petunjuk tentang bagaimana sistem kekebalan mengakomodasi konsepsi alogenik untuk bertahan hidup dan menghindari penolakan sistem kekebalan. Untuk menyelidiki lebih lanjut potensi diagnostik gen yang diidentifikasi dalam penelitian ini, penelitian tambahan diperlukan untuk menganalisis spesifisitas dan sensitivitas biomarker ini untuk memprediksi kebuntingan dini pada seekor sapi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh USDA Hatch Act Formula Fund WIS03061 dari University of Wisconsin, Madison. Para penulis berterima kasih kepada dokter hewan Pablo Ross, David Kendall, Alan Mileham, dan ST-Genetics-Wisconsin yang telah menyediakan sampel darah dan data hasil kehamilan.

REFERENSI

Balhara, AK, M. Gupta, S. Singh, AK Mohanty, dan I. Singh. 2013. Diagnosis kebuntingan dini pada sapi: status saat ini dan arah masa depan. ScientificWorldJournal 958540:1–10.https://doi . org/10.1155/2013/958540.

Basavaraja, R., JN Drum, J. Sapuleni, L. Bibi, G. Friedlander, S. Kumar, R. Sartori, dan R. Meidan. 2021. Jalur luteolitik yang diturunkan regulasi dalam transkriptom korpus luteum sapi pada awal kehamilan ditiru oleh interferon-tau in vitro. Genomik BMC 22:452.https://doi.org/10.1186/s12864-021-07747-3. Basavaraja, R., ST Madusanka, JN Drum, K. Shrestha, S. Farberov, MC Wiltbank, R. Sartori, dan R. Meidan. 2019. Interferon-Tau Melakukan Tindakan Prosurvival dan Antiapoptosis Langsung pada Sel Bovine Granulosa yang Diluteinisasi. Sains. Ulangan 9:14682.https://doi . org/10.1038/s41598-019-51152-6.

Bazer, FW 2013. Mekanisme sinyal pengenalan kehamilan di ruminansia dan babi. J.Anim. Sains. Bioteknologi. 4:23.https://doi . org/10.1186/2049-1891-4-23.

Benjamini, Y., dan Y. Hochberg. 1995. Mengontrol penemuan palsu rate: pendekatan praktis dan kuat untuk beberapa pengujian. Statistik JR. sosial. B 57:289–300.https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995 . tb02031.x.

Bo, GA, dan RJ Mapletoft. 2013. Evaluasi dan klasifikasi embrio sapi. animasi. mereproduksi. 10:344–348.

Bolger, AM, M. Lohse, dan B. Usadel. 2014. Trimmomatic: fleksibel pemangkas untuk data urutan Illumina. Bioinformatika 30:2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170.

Borroni, EM, R. Bonecchi, C. Buracchi, B. Savino, A. Mantovani, dan M.Locati. 2008. Reseptor umpan kemokin: Pemain baru dalam imunologi reproduksi. imunol. Menginvestasikan. 37:483–397.https://doi.org/10.1080/08820130802191318.

Bridi, A., K. Bertolin, VB Rissi, LKS Mujica, WG Glanzner, MP de Macedo, FV Comim, PBD Gonçalves, dan AQ Antoniazzi. 2018. Embrio sapi partenogenetik mengeluarkan interferon tipe I yang mampu merangsang ISG15 dalam kultur sel luteal. animasi. mereproduksi. 15:1268–1277.https://doi.org/10.21451/1984-3143 - AR2018-0095.

Brooks, K., G. Burns, dan TE Spencer. 2014. Konseptus elongation pada ruminansia: peran progesteron, prostaglandin, interferon tau dan kortisol. J.Anim. Sains. Bioteknologi. 5:53.https://doi.org/10 . 1186/2049-1891-5-53.

Callesen, H., T. Greve, dan F. Christensen. 1987. Dipandu secara ultrasonik-ed aspirasi oosit folikel sapi. Teriogenologi 27:217. https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90094-X.

Chaney, H., L. Grose, G. Charpigny, S. Behura, M. Sheldon, J. Cronin, P. Lonergan, T. Spencer, dan D. Matthew. 2021. Ekspresi gen yang bergantung pada interferon tau yang diinduksi konseptus dalam sel epitel dan stroma endometrium sapi. biologi. mereproduksi. 104:669–683. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa226.

De Los Santos, JA, Andrade, JPN, Cangiano, LR, Iriarte, A., Peñagaricano, F., & Parrish, JJ 2023. Analisis transkriptomik mengungkap perubahan ekspresi gen sel darah putih perifer sapi setelah transfer embrio: Implikasi terhadap toleransi kebuntingan. *Reproduksi pada hewan peliharaan = Zuchthygiene*,https://doi.org/10.1111/rda.14371. Publikasi online tingkat lanjut. https://doi.org/ https://doi.org/10.1111/rda.14371

Dobin, A., CA Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, dan TR Gingeras. 2013. STAR: penyelaras RNA-seq universal ultracepat. Bioinformatika 29:15–21.https://doi . org/10.1093/bioinformatika/bts635.

Du, MR, SC Wang, dan DJ Li. 2014. Peran integratif chemokines pada antarmuka ibu-janin pada awal kehamilan. Sel. mol. imunol. 11:438–448.https://doi.org/10.1038/cmi.2014.68. Dutta, S., dan P. Sengupta. 2017. Mendefinisikan fase kehamilan dengan pergeseran sitokin. J.Kehamilan 1.https://doi.org/10.15761/JPR . 1000124.

Ferraz, PA, CASG Filho, CC Rocha, AL Neto, G. de Andrade Bruni, TSI Oshiro, PS Baruselli, FS Lima, dan G. Pugliesi. 2021. Kelayakan dan keakuratan penggunaan berbagai metode untuk mendeteksi kebuntingan berdasarkan gen yang merangsang konseptus pada sapi perah. Komunitas JDS. 2:153–158.https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-0062. Filho, R., GA Franco, ST Reese, FG Dantas, P. Fontes, RF Cooke, JD Rhinehart, KW Thompson, dan KG Pohler. 2020. Penggunaan Glikoprotein Terkait Kehamilan (PAG) untuk Deteksi Kebuntingan Hari Ke-24 Kebuntingan pada Sapi Potong. Teriogenologi 141:128–133.https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09 . 014.

Fiorenza, MF, MA Marey, MB Rashid, MA Zinnah, D.Ma, VA Morillo, K. Kusama, M. Shimada, K. Imakawa, AQ Antoniazzi, dan A. Miyamoto. 2021. Neutrofil mengenali dan memperkuat sinyal IFNT yang berasal dari embrio sapi hari ke-7 untuk stimulasi ekspresi ISG in vitro: Kemungkinan implikasi pada pengenalan awal kehamilan oleh ibu. Biokimia. Biofisika. Res. Komunitas. 553:37–43. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.03.037. Gajewski, Z., M. Pertajitis, N. Sousa, J. Beckers, B. PawliNbermain ski, dan F.Janett. 2009. Glikoprotein terkait kehamilan sebagai alat diagnostik baru dalam reproduksi sapi. Schweiz. Lengkungan. Tierheilkd. 151:577–582.https://doi.org/10.1024/0036-7281.151.12.577. Galaviz-Hernandez, C., E. Arámbula-Meraz, D. Medina-Bastidas, M. Sosa-Macías, BP Lazalde-Ramos, M. Ortega-Chavez, dan L. Hernandez-García. 2016. Polimorfisme ayah rs5370 pada gen EDN1 menurunkan risiko preeklampsia. Kehamilan Hiperten. 6:327–332.https://doi.org/10.1016/j.preghy.2016.07.002.

Garrido-Gomez, T., K. Ona, M. Kapidzic, M. Gormley, C. Simon, O. Genbacev, dan S. Fisher. 2017. Pre-eklampsia berat dikaitkan dengan perubahan sitotrofoblas pada korion halus. Perusahaan Ahli Biologi 144:767–777.

George, EM, dan JP Granger. 2012. Menghubungkan iskemia plasenta dan hipertensi pada preeklampsia. Hipertensi 60:507–511.https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.194845.

Gifford, CA, BH Aloqaily, dan JA Hernandez Gifford. 2019. SIMPOSIUM DAGING SAPI KAKTU SPESIES-RUMINAN NUTRISI DAGING: Modulasi imunitas ibu sebelum embrio tiba di rahim penting untuk pembentukan kebuntingan pada sapi1. J.Anim. Sains. 97:3605–3610.https://doi.org/10.1093/jas/skz160.

Gifford, CA, K. Racicot, DS Clark, KJ Austin, TR Hansen, MC Lucy, CJ Davies, dan TL Ott. 2007. Regulasi gen yang distimulasi interferon pada leukosit darah tepi pada wanita hamil

dan memelihara sapi perah yang tidak hamil. J. Ilmu Susu. 90:274–280.https: //doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72628-0.

Green, JC, CS Okamura, SE Poock, dan MC Lucy. 2010. Pengukurankepastian interferon-tau (IFN-tau) merangsang ekspresi gen dalam leukosit darah untuk diagnosis kehamilan dalam waktu 18-20 hari setelah inseminasi pada sapi perah. animasi. mereproduksi. Sains. 121:24–33.https: //doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.05.010.

Gui, S., S. Ni, J. Jia, Y. Gong, L. Gao, L. Zhang, dan R. Zhou. 2014. Ketidaksesuaian kadar plasma CXCL3 dan ekspresi plasenta pada preeklampsia serta pengaruhnya terhadap viabilitas dan invasi trofoblas. PLoS Satu 9:e114408.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114408.

Hannan, N., R. Jones, C. White, dan L. Salamonsen. 2006. Kemokines, CX3CL1, CCL14, dan CCL4, mendorong migrasi trofoblas manusia pada antarmuka feto-ibu. biologi. mereproduksi. 74:896–904. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045518.

Hansen, TR, LDP Sinedino, dan TE Spencer. 2017. Parakrin dan tindakan endokrin interferon tau (IFNT). Reproduksi 154:F45–F59.https://doi.org/10.1530/REP-17-0315. Hirayama,

H., S. Moriyasu, S. Kageyama, K. Sawai, H. Takahashi, M. Geshi, T. Fujii, T. Koyama, K. Koyama, A. Miyamoto, M. Matsui, dan A. Minamihashi. 2014. Peningkatan pengenalan kehamilan oleh ibu dengan embrio partenogenetik pada transfer embrio sapi. Teriogenologi 81:1108–1115.https://doi.org/10.1016/j . theriogenologi.2014.01.039.

Islam, MA, M. Takagi, K. Fukuyama, R. Komatsu, L. Albarracin, T. Nochi, Y. Suda, W. Ikeda-Ohtsubo, V. Rutten, WV Eden, J. Villena, H. Aso, dan H. Kitazawa. 2020. Analisis Transkriptome Respon Inflamasi Sel Epitel Susu Sapi: Menjelajahi Gen Target Imunomodulator pada Mastitis Sapi. Patogen 9:200.https://doi.org/10.3390/pathogens9030200. Kasimanickam, R., V.

Kasimanickam, dan K. Grende. 2020. Endomeuji coba ekspresi berbagai gen (ISGs, PPARs, RXRs dan MUC1) pada hari ke 16 pasca ovulasi pada sapi peternak berulang, dengan atau tanpa endometritis subklinis. Teriogenologi 145:251–259.https://doi . org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.036.

Korth, P., RM Bohle, P. Corvol, dan F. Pinet. 1999. Diskon seluler kontribusi enzim-1 pengubah endotelin dalam jaringan manusia. J. Histokimia. Sitokimia. 47:447–461.https://doi.org/10.1177/002215549904700403.

Kowalczyk, A., E. Czerniawska-PiAtkowska, dan M. WrzeciNska. 2021. Pentingnya Interferon-Tau dalam Diagnosis Kehamilan. BioMed Res. Int. 9915814:1–6.https://doi.org/10.1155/2021/9915814.

Livak, KJ, dan TD Schmittgen. 2001. Analisis gen relatif data ekspresi menggunakan PCR kuantitatif waktu nyata dan 2(-Delta Delta C(T)). Metode 25:402–408.https://doi.org/10.1006/meth . 2001.1262.

Magee, DA, KM Conlon, NC Nalpas, JA Browne, C. Pirson, C. Healy, KE McLoughlin, J. Chen, HM Vordermeier, E. Gormley, DE MacHugh, dan SV Gordon. 2014. Profil sitokin bawaan makrofag alveolar sapi mengungkapkan kesamaan dan perbedaan dalam respons terhadap infeksi Mycobacterium bovis dan Mycobacterium tuberkulosis. Tuberkulosis (Edinb.) 94:441–450. https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.04.004.

Malik, A., dan TD Kanneganti. 2018. Fungsi dan regulasi IL-1α pada penyakit inflamasi dan kanker. imunol. Wahyu 281:124–137.https://doi.org/10.1111/imr.12615.

Mishra. SR dan Sarkar, M. 2018. Gen terstimulasi interferon (ISG): Biomarker khusus kehamilan baru pada kerbau (Bubalus bubalis). *Jurnal Ilmu Imunologi*.

Oliveira, Lj., RSN Barreto, F. Perecin, N. Mansouri-Attia, FT V. Pereira, dan FV Meirelles. 2012. Modulasi sistem imun ibu pada masa bunting pada sapi. mereproduksi. Domestik. animasi. 47(s4):384–393.https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012 . 02102.x.

Peñagaricano, F., AH Souza, PD Carvalho, AM Driver, R. Gambra, J. Kropp, KS Hackbart, D. Luchini, RD Shaver, MC Wiltbank, dan H. Khatib. 2013. Pengaruh suplementasi metionin ibu terhadap transkriptom praimplantasi sapi embrio. PLoS Satu 8:e72302.https://doi.org/10.1371/journal . pone.0072302.

Pieterse, MC, KA Kappen, Th. AM Kruip, dan MAM Taverne. 1988. Aspirasi oosit sapi selama pemindaian ultrasonografi transvaginal pada ovarium. Teriogenologi 30:751–762.https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90310-X.

Pieterse, MC, PL Vos, TA Kruip, YA Wurth, TH van Beneden, AH Willemse, dan MA Taverne. 1991. USG transvaginal memandu aspirasi folikel oosit sapi. Teriogenologi 35:857–862.https://doi.org/10.1016/0093 - 691X(91)90426-E.

Platanias, LC 2005. Mekanisme interferon tipe-1 dan tipe-II sinyal yang dimediasi. Nat. Pendeta Imunol. 5:375–386.https://doi . org/10.1038/nri1604.

Pohler, KG, Franco, GA, Reese, ST, Dantas, FG, Ellis, MD, & Payton, RR 2016. Metode deteksi kehamilan masa lalu, sekarang dan masa depan. Strategi Reproduksi Terapan pada Sapi Potong. (367–376).

Ramu, S., C. Stamatkin, L. Timms, M. Ruble, RG Roussev, dan E. R.Barnea. 2013. Deteksi faktor PreImplantasi (PIF) dalam sirkulasi ibu pada awal kehamilan berkorelasi dengan kelahiran hidup (bovine model). Biologi reproduksi dan endokrinologi. mereproduksi. biologi. Endokrinol. 11:105.https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-105. Rani, MR,

J. Shrock, S. Appachi, RA Rudick, BR Williams, dan RM Ransohoff. 2007. Ekspresi gen baru yang diinduksi interferon-beta dalam sel darah tepi. J.Leukoc. biologi. 82:1353–1360.https://doi.org/10.1189/jlb.0507273.

Rashid, MB, AK Talukder, K. Kusama, S. Haneda, T. Takedomi, H. Yoshino, S. Moriyasu, M. Matsui, M. Shimada, K. Imakawa, dan A. Miyamoto. 2018. Bukti bahwa interferon-tau yang dikeluarkan dari embrio Hari ke-7 in vivo menghasilkan respon imun anti-inflamasi pada rahim sapi. Biokimia. Biofisika. Res. Komunitas. 500:879–884. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.178. Ren, J., Y. Zhang, J. Jia, L.

Dai, Y. Wang, B. Zhou, dan R. Zhou. 2022. Hubungan Polimorfisme Gen CXCL3 dengan Preeklampsia. J. Ibu. Obat Neonatal Janin. 35:258–262.https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1716332.

Robinson, MD, DJ McCarthy, dan GK Smyth. 2010. tepiR: a Paket biokonduktor untuk analisis ekspresi diferensial data ekspresi gen digital. Bioinformatika 26:139–140.https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616.

Rocha, CC, SC da Silva Andrade, GD de Melo, IG Motta, LL Coutinho, AM Gonella-Diaza, M. Binelli, dan G. Pugliesi. 2020. Transkrip yang diinduksi kehamilan dini pada sel imun darah tepi pada sapi dara bos indicus. Sains. Ulangan 10:10.https://doi.org/10.1038/s41598-020-70616-8.

Rutigliano, HM, Thomas, AJ, Umbaugh, JJ, Wilhelm, A., Sessions, BR, Kaundal, R., Duhan, N., Hicks, BA, Schlafer, DH, White, KL, & Davies, CJ 2022. Peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi pada antarmuka janin-ibu pada kehamilan sapi yang dihasilkan oleh kloning.*Jurnal imunologi reproduksi Amerika (New York, NY: 1989), 87*(3), e13520.https://doi . org/10.1111/aji.13520

Sajid, M., H. Ullah, K. Yan, M. He, J. Feng, MA Shereen, R. Hao, Q. Li, D. Guo, Y. Chen, dan L. Zhou. 2021. Aktivitas fungsional dan antivirus IFI6 yang diinduksi alfa interferon terhadap replikasi virus hepatitis B dan ekspresi gen. Depan. imunol. 12:634937. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.634937.

Spencer, TE, N. Forde, dan P. Lonergan. 2016. Wawasan tentang pemanjangan septus dan pembentukan kebuntingan pada ruminansia. mereproduksi. Subur. Dev. 29:84–100.https://doi.org/10.1071/RD16359.

Talukder, AK, MA Marey, K. Shirasuna, K. Kusama, M. Shimada, K.Imakawa, dan A.Miyamoto. 2020. Peta jalan kebuntingan 7 hari pertama pasca inseminasi pada sapi: Crosstalk imun pada korpus luteum, saluran telur, dan rahim. Teriogenologi 150:313– 320. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.071.

Talukder, AK, Rashid, MB, Takedomi, T., Moriyasu, S., Imakawa, K., & Miyamoto, A. 2019. Embrio hari ke-7 menghasilkan respon imun anti inflamasi pada sel imun darah tepi pada sapi superovulasi. Jurnal imunologi reproduksi Amerika

(New York, NY: 1989), 81(2), e13069.https://doi.org/10.1111/aji.13069

Temesgen, MY, AA Assen, TT Gizaw, BA Minalu, dan A. Y. Mersha. 2022. Faktor-faktor yang mempengaruhi interval beranak hingga konsepsi (hari terbuka) pada sapi perah yang berlokasi di kota Dessie dan Kombolcha, Ethiopia. PLoS Satu 17:e0264029.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264029.

Thomas, ES 2013. Kehamilan dini: Konsep, tantangan, dan posolusi sementara. animasi. Depan. 3:48–55.https://doi.org/10.2527/af.2013-0033.

Toji, N., Shigeno, S., Kizaki, K., Koshi, K., Matsuda, H., Hashiyada, Y., Imai, K., Takahashi, T., Ishiguro-Oonuma, T., & Hashizume, K. 2017. Evaluasi gen yang distimulasi interferon dalam granulosit darah tepi sebagai respon sensitif terhadap sinyal konseptus awal sapi.*Jurnal kedokteran hewan (London, Inggris: 1997), 229*, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.007

Villamayor, L., V. Rivero, D. López-García, DJ Topham, L. Martínez-Sobrido, A. Nogales, dan ML DeDiego. 2023. Interferon alpha inducible protein 6 adalah regulator negatif respon imun bawaan dengan memodulasi aktivasi RIG-I. Depan. imunol. 14:1105309.https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1105309.

Wallace, RM, KG Pohler, MF Smith, dan JA Green. 2015. Rencana-PAG sentral: asal gen, pola ekspresi, dan digunakan sebagai penanda kehamilan. Reproduksi 149:R115–R126.https://doi.org/10.1530/REP-14-0485.

Wang, H., T. Wang, L. Dai, W. Cao, L. Ye, L. Gao, B. Zhou, dan R. Zhou. 2018. Pengaruh CXCL3 terhadap migrasi, invasi, proliferasi dan pembentukan tabung sel trofoblas. Plasenta 66:47–56.https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.05.004.

Wonfor, RE, CJ Creevey, M. Natoli, M. Hegarty, DM Nash, dan MT Mawar. 2020. Interaksi faktor praimplantasi dengan transkriptom endometrium sapi global. PLoS Satu 15:e0242874. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242874.

Wright, M., DE Goin, MK Smed, NP Jewell, JL Nelson, J. Olsen, ML Hetland, V. Zoffmann, dan D. Jawaheer. 2023. Ekspresi gen sistemik terkait kehamilan dibandingkan dengan garis dasar sebelum hamil, pada wanita sehat dengan kehamilan cukup bulan. Depan. imunol. 14:1161084.https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161084.

Yamamoto, Y., M. Kohka, Y. Kobayashi, I. Woclawek-Potocka, dan K.Okuda. 2016. Endothelin sebagai faktor pengatur lokal pada saluran telur sapi. mereproduksi. Subur. Dev. 28:673–681.https://doi.org/10.1071/RD14076.

Yoshino, H., K. Kizaki, T. Hirata, K. Iga, H. Matsuda, T. Yamanouchi, Y. Hashiyada, K. Imai, T. Ishiguro-Oonuma, T. Kanazawa, T. Takahashi, dan K. Hashizume. 2023. Ekspresi gen yang distimulasi interferon dalam leukosit darah tepi sebagai penanda prediksi yang tepat untuk status embrio pada Sapi Hitam Jepang yang ditransfer embrio selama periode peri-implantasi. Dokter hewan. Sains. 10:408. https://doi.org/10.3390/vetsci10070408.

Yoshino, H., K. Kizaki, K. Iga, T. Hirata, H. Matsuda, T. Yamanouchi, Y. Hashiyada, N. Toji, T. Ishiguro-oonuma, T. Takahashi, dan K. Hashizume. 2020. Penggunaan metode prediksi status kebuntingan dini dengan menggunakan analisis kurva karakteristik operasi penerima gen stimulasi interferon leukosit darah tepi pada sapi hitam Jepang. animasi. mereproduksi. Sains. 214:106283.https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106283.

Zhang, S., J. Ding, Y. Zhang, S. Liu, J. Yang, dan T. Yin. 2022. Regulasi dan fungsi kemokin pada antarmuka ibu. Depan. Pengembang Sel. biologi. 10:826053.https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826053.

Zoli, AP, P. Demez, JF Beckers, M. Reznik, dan A. Beckers. 1992. Imunolokalisasi mikroskopis cahaya dan elektron dari glikoprotein terkait kehamilan sapi di plasenta sapi. biologi. mereproduksi. 46:623–629.https://doi.org/10.1095/biolreprod46.4.623.

M.Marey https://orcid.org/0000-0002-7545-327X
H.Khatib https://orcid.org/0000-0003-1312-1453

Jurnal Ilmu Hewan, 2022,**100**, 01–17
https://doi.org/10.1093/jas/skac091
Publikasi akses lanjutan 1 Juli 2022
Artikel Unggulan

Suplemen bioaktif mempengaruhi perkembangan embrio in vitro sapi

Lydia K.Woldridge,[†,1] Jessica A.Keane,[†] Michelle L.Rhoads,[†] dan Alan D.Ealy[†,2],

[†]Departemen Ilmu Hewan dan Unggas, Institut Politeknik Virginia dan Universitas Negeri, Blacksburg, VA, AS

[1]Alamat sekarang: Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, ME 04609, USA
[2]Penulis yang sesuai:ealy@vt.edu

Abstrak

Pengambilan sel telur dan produksi in vitro (**IVP**) embrio sapi menggantikan transfer embrio ovulasi ganda tradisional (**MOET**) sebagai sarana utama untuk menghasilkan embrio yang dapat dipindahtangankan dari indukan dan induk yang secara genetis elit. Namun, ketidakefisienan dalam proses IVP membatasi peluang untuk menghasilkan sejumlah besar embrio yang dapat ditransfer. Selain itu, kompetensi pasca transfer embrio IVP lebih rendah dibandingkan embrio yang dihasilkan melalui inseminasi buatan atau MOET. Banyak faktor yang berhubungan dengan ibu, ayah, embrio, dan budaya dapat berdampak buruk pada keberhasilan IVP. Tinjauan ini akan mengeksplorasi berbagai upaya yang dilakukan untuk menggambarkan bagaimana perkembangan embrio IVP dan kompetensi pasca transfer dapat ditingkatkan dengan menambah hormon, faktor pertumbuhan, sitokin, steroid dan faktor bioaktif lainnya yang ditemukan di saluran telur dan rahim selama awal kehamilan. Lebih dari 40 faktor tersebut, yang secara kolektif disebut sebagai embrio, diulas di sini. Beberapa embriokin mengandung kemampuan untuk mendorong perkembangan embrio, termasuk meningkatkan kelangsungan hidup embrio, meningkatkan jumlah sel blastomer, dan mengubah distribusi jenis sel blastomer dalam blastokista. Beberapa embriokin terpilih juga dapat bermanfaat bagi retensi kehamilan setelah transfer embrio IVP dan meningkatkan kesehatan dan kinerja anak sapi neonatal, meskipun sangat sedikit penelitian transfer embrio yang dilengkapi dengan suplemen embriokin yang telah diselesaikan. Selain itu, melengkapi beberapa embrio pada saat yang sama menjanjikan peningkatan pengembangan dan kompetensi embrio IVP. Namun, diperlukan lebih banyak penelitian untuk mengeksplorasi konsekuensi pasca-transfer dari penambahan embriokin yang diduga dapat menimbulkan dampak buruk, seperti sindrom keturunan besar dan kesehatan pascakelahiran yang buruk, dan untuk menentukan kombinasi embriokin spesifik yang paling mewakili kondisi ideal yang ditemukan di dunia. saluran telur dan rahim.

Ringkasan Awam

Pengambilan sel telur dan produksi in-vitro (**IVP**) embrio sapi dengan cepat menjadi pilihan komersial untuk menghasilkan embrio sapi yang dapat dipindahtangankan dalam jumlah besar dari indukan dan induk yang secara genetik elit. Namun, 2 batasan dalam proses ini masih ada. Pertama, persentase telur/oosit yang dibuahi dan menghasilkan embrio yang dapat ditransfer masih rendah. Kedua, embrio IVP yang ditransfer ke penerima kurang mampu mempertahankan kehamilan dibandingkan embrio yang dihasilkan dengan cara lain. Berbagai faktor yang berhubungan dengan ibu, ayah, embrio, dan budaya akan mempengaruhi keberhasilan IVP. Tinjauan ini menjelaskan bagaimana perkembangan embrio IVP dan kompetensi embrio pasca transfer dapat ditingkatkan dengan menambah hormon, faktor pertumbuhan, sitokin, steroid, dan faktor bioaktif lainnya yang ditemukan di saluran telur dan rahim selama awal kehamilan. Faktor-faktor ini secara kolektif disebut sebagai embriokin. Beberapa embriokin akan mendorong perkembangan embrio IVP, namun hanya sedikit dari embrio tersebut yang telah diuji kemampuannya dalam meningkatkan retensi kehamilan pasca transfer embrio. Diperlukan lebih banyak penelitian untuk mengeksplorasi konsekuensi pasca-transfer dari penambahan embriokin. Namun demikian, semua indikasi menunjukkan bahwa kita berada di jalur yang benar dalam mengidentifikasi satu atau mungkin beberapa embrio yang akan meningkatkan perkembangan embrio IVP dan retensi kebuntingan pasca transfer pada sapi.

Kata kunci:sitokin, embriokin, perkembangan embrio, faktor pertumbuhan

Singkatan:ACTA, aktivin A; AI, inseminasi buatan; AKT, transformasi regangan Ak; BMP, protein morfogenetik tulang; CNTF, faktor neurotropik silia; CTGF, faktor pertumbuhan jaringan ikat; CSF, faktor perangsang koloni; CSF2RA, alfa reseptor faktor 2 perangsang koloni; CSF2RB, beta reseptor faktor 2 perangsang koloni; DHA, asam docosahexaenoic; DKK1, Penghambat Jalur Sinyal Dickkopf WNT 1; E2, estradiol 17 beta; EGF, faktor pertumbuhan epidermal; EGFR, reseptor faktor pertumbuhan epidermal; ET, transfer embrio; FBS, serum janin sapi; FGF, faktor pertumbuhan fibroblas; FGFR, reseptor faktor pertumbuhan fibroblas; FST, folistatin; GDF, faktor diferensiasi pertumbuhan; GH, hormon pertumbuhan; GHR, reseptor hormon pertumbuhan; HA, asam hialuronat; HDGF, faktor pertumbuhan turunan hepatoma; HGF, faktor pertumbuhan hepatosit; IGF, faktor pertumbuhan seperti insulin; IGF1R, reseptor faktor pertumbuhan 1 seperti insulin; ICM, massa sel dalam; IFN, interferon; IFNT, interferontau; IL, interleukin; IL1B, interleukin-1 beta; IL6R, reseptor interleukin 6; IL6ST, transduser sinyal interleukin 6; IVP, diproduksi secara in vitro; JAK, Janus kinase; LA, asam linoleat; LIF, faktor penghambat leukemia; LIFR, reseptor faktor penghambat leukemia; LPA, asam lisofosfatidat; LPAR, reseptor asam lisofosfatidat; MAPK, protein kinase yang diaktifkan mitogen; MOET, transfer embrio ovulasi ganda; MT, melatonin; MTNR1A, reseptor melatonin 1A; MTNR1B, reseptor melatonin 1B; NCL, nukleolin; NFkB, faktor nuklir kappa B; NGF, faktor pertumbuhan saraf; OSM, oncostatin-M; P4, progesteron; PDGF, faktor pertumbuhan turunan trombosit; PrE, endoderm primitif; PGE2, prostaglandin E2; PGF2, prostaglandin F2 alfa; PI3K, fosfoinositida 3-kinase; PPAR, reseptor yang diaktifkan proliferator peroksisom; PPARD, delta reseptor yang diaktifkan proliferator peroksisom; PPARG, gamma reseptor yang diaktifkan proliferator peroksisom; PUFA, asam lemak tak jenuh ganda; RAR, reseptor asam retinoat; ROS, spesies oksigen reaktif; RXR, reseptor asam retinoat X; SCF, faktor sel induk; SMAD, ibu kecil melawan decapentaplegic; STAT, transduser sinyal dan aktivator transkripsi; T, triiodotironin; T, tiroksin; TE, trofektoderm; TDGF1, faktor pertumbuhan turunan teratokarsinoma 1; TGF, mentransformasikan faktor pertumbuhan; TGFA, mengubah faktor pertumbuhan α; TGFB, mengubah faktor pertumbuhan β; TNF, faktor nekrosis tumor; TNFA, faktor nekrosis tumor alfa; WNT, integrasi terkait tanpa sayap; VEGFA, faktor pertumbuhan endotel vaskular A

Diterima 5 Februari 2022 Diterima 21 Maret 2022.

© Penulis 2022. Diterbitkan oleh Oxford University Press atas nama American Society of Animal Science. Seluruh hak cipta. Untuk izin, silakan kirim email ke:jurnal.permissions@oup.com.

Perkenalan

Terdapat pertumbuhan pesat dalam penggunaan fertilisasi in vitro dan kultur embrio untuk produksi embrio pada sapi dalam beberapa tahun terakhir. Lebih dari 1 juta diproduksi secara in vitro (**IVP**) embrio sapi diproduksi di seluruh dunia pada tahun 2019 (Viana, 2019). Sekitar 90% embrio diproduksi di Amerika Utara dan Selatan dari oosit yang dipanen melalui pengambilan sel telur (Viana, 2019). Pengambilan sel telur dan IVP merupakan alternatif yang menarik dibandingkan ovulasi ganda dan transfer embrio (**DAN**) karena peningkatan hasil embrio serta kemampuan memanen oosit dari sapi dara pra-pubertas dan induk bunting. Namun, terdapat inefisiensi yang signifikan pada embrio IVP, yaitu hanya 20% hingga 40% oosit yang akan menghasilkan embrio yang dapat ditransfer dan hanya 30% hingga 40% dari embrio IVP yang ditransfer akan menghasilkan anak sapi (diulas dalamEaly dkk., 2019; Hansen, 2020).

Berbagai faktor mempengaruhi keberhasilan embrio IVP, termasuk faktor ibu/ayah (misalnya kesuburan penerima), faktor embrionik (misalnya aneuploidies/mixoploidies, genetika embrio, dan riwayat kesehatan donor), dan faktor kultur in vitro (misalnya paparan terhadap cahaya, komposisi media kultur, dan suhu yang berfluktuasi;Ealy dkk., 2019;Hansen, 2020). Salah satu titik fokus dalam penelitian embrio IVP sapi adalah memperbaiki kondisi kultur embrio in vitro. Formasi media berbasis embrio mengandung garam, sumber energi (laktat, piruvat, fosfat, glukosa, dan asam amino), dan sumber makromolekul (biasanya albumin serum sapi atau serum janin sapi). Sebagian besar kondisi kultur bersifat statis, sehingga embrio tetap berada dalam tetesan medium yang sama dari tahap zigot hingga blastokista. Selain itu, sebagian besar formulasi media embrio tidak mengandung berbagai enzim, vesikel ekstraseluler, dan zat gizi mikro yang ditemukan di saluran telur dan rahim selama periode awal perkembangan embrio. Formulasi media ini juga tidak mengandung hormon, sitokin, dan faktor pertumbuhan yang ditemukan di saluran telur dan rahim selama 7 hingga 8 hari pertama pasca estrus (Martins dkk., 2018;Tribulo dkk., 2018b). Banyak dari faktor bioaktif ini sering didefinisikan sebagai faktor embriotrofik atau embriokin karena kemampuannya memfasilitasi perkembangan awal embrio. Suplementasi dengan serum janin sapi (**FBS**) mungkin mengkompensasi sebagian kekurangan beberapa embrio ini; namun, hal ini tidak ideal karena komposisi FBS dapat bervariasi dari satu batch ke batch lainnya. Selain itu, meskipun banyak faktor yang mempengaruhi sindrom keturunan besar di masa lalu telah diatasi, mungkin masih terdapat beberapa pengaruh sisa suplementasi FBS terhadap ukuran anak sapi (Rivera, 2019;Siqueira dkk., 2019). Cara yang lebih disukai untuk mensimulasikan lingkungan oviduktal dan uterus adalah dengan mengembangkan kombinasi embriokin tertentu yang akan mendorong perkembangan embrio in vitro sedekat mungkin dengan apa yang biasanya terjadi di saluran reproduksi.

Tinjauan ini akan fokus pada penjelasan bagaimana media kultur embrio dapat dimodifikasi sehingga mengandung embriokin yang mendorong embriogenesis "normal". Lebih dari 40 embriokin dugaan telah dipelajari selama 3 dekade terakhir untuk mengetahui kemampuannya dalam meningkatkan sistem kultur embrio sapi in vitro. Tinjauan ini akan menjelaskan berapa banyak embrio yang mempengaruhi pembentukan blastokista, kualitas embrio, dan jumlah sel embrio serta apoptosis. Selain itu, jika ada informasi, kami akan menjelaskan bagaimana suplementasi dengan faktor-faktor tertentu sebelum ET mempengaruhi retensi kehamilan dan kesehatan anak sapi neonatal dan pascakelahiran. Tinjauan ini juga berisi wawasan tentang penggunaan koktail embriokin selama kultur embrio. Deskripsi dan kutipan untuk setiap faktor yang termasuk dalam naskah ini disediakan dalam Tabel Tambahan S1 dan S2.

Insulin dan Faktor Pertumbuhan Seperti Insulin

Asal usul eksplorasi insulin sebagai embriokin kemungkinan besar berasal dari dimasukkannya insulin sebagai faktor kelangsungan hidup dalam formasi media bebas serum dalam sistem kultur sel somatik. Sebaliknya, dimasukkannya faktor pertumbuhan mirip insulin (**IGF**) 1 dan 2 kemungkinan besar muncul karena hubungan definitif dengan embriogenesis pada banyak mamalia. Baik IGF1 dan IGF2 terkenal karena keterlibatannya dalam pertumbuhan dan perkembangan organisme. Tikus dengan mutasi nol pada keduanya *Igf1*atau *Igf2*lebih kecil dibandingkan jenis liar dan menunjukkan hipoplasia organ, keterlambatan pengerasan tulang, dan kelainan sistem saraf pusat (Baker dkk., 1993, 1996;Liu dkk., 1993). Sebaliknya, ekspresi berlebih IGF1 atau IGF2, yang terkadang terjadi akibat hilangnya pencetakan pada embrio IVP, meningkatkan bobot tubuh dan dapat menyebabkan sindrom Beckwith-Wiedmann pada manusia dan sindrom keturunan besar pada sapi (Mathews dkk., 1988;Smith dkk., 2015). Keduanya merupakan sindrom pertumbuhan berlebih yang ditandai dengan makrosomia.

Insulin

Insulin telah ditambahkan ke embrio sapi IVP pada berbagai konsentrasi (dari 1 pg/mL hingga 100 µg/mL). Ada beberapa laporan yang menunjukkan bahwa suplementasi insulin akan menurunkan apoptosis blastomer (Byrne dkk., 2002; Wydooghe dkk., 2014), namun secara umum insulin tidak mempengaruhi pembentukan blastokista atau jumlah sel (Matsui dkk., 1995; Mihalik dkk., 2000;Byrne dkk., 2002;Wydooghe dkk., 2014). Beberapa penelitian mendeteksi peningkatan produksi blastokista setelah menggabungkan pengobatan insulin dengan suplementasi glukosa (Liu dkk., 1995;Agustin dkk., 2003), meskipun kelompok lain gagal mendeteksi manfaat dari kombinasi pengobatan ini (Byrne dkk., 2002). Kebutuhan glukosa untuk efek insulin masuk akal, karena fungsi utama insulin adalah merangsang pengambilan glukosa oleh sel (Tokarz dkk., 2018), dan insulin mungkin sangat penting pada tahap blastokista ketika trofektoderm (**TE**) sel mulai menggunakan glukosa (Thompson dkk., 1996;Khurana dan Niemann, 2000). Namun sekali lagi, terdapat laporan berbeda mengenai apakah suplementasi insulin meningkatkan jumlah sel blastokista (Matsui dkk., 1995;Byrne dkk., 2002;Agustin dkk., 2003). Pada akhirnya, manfaat insulin dalam media kultur embrio masih belum jelas, namun tampaknya embrio lain perlu mendapat perhatian lebih besar ketika memformulasikan suplemen media yang dapat memaksimalkan produksi embrio sapi in vitro.

Faktor Pertumbuhan Seperti Insulin

Baik IGF1 dan IGF2 diproduksi oleh saluran telur dan uterus sapi pada periode awal diestrus (Geisert dkk., 1991 ; Robinson dkk., 2000;Pushpakumara dkk., 2002;Rhoads dkk., 2008;Tribulo dkk., 2018b), dan embrio sapi praimplantasi berisi transkrip untuk*IGF1*Dan*IGF2*dan untuk reseptor IGF1,*IGF1R*, yang dapat bereaksi silang dengan IGF1 dan IGF2 (Schultz dkk., 1992;Yasin dkk., 2001 ;Wang dkk., 2009).

Efek IGF1 pada embrio sapi IVP telah dipelajari secara luas selama 3 dekade terakhir. Penelitian telah menemukan bahwa IGF1 diperlukan untuk produksi embrio sapi in vitro yang optimal mengingat knockdown IGF1R mengurangi perkembangan blastokista (Wang dkk., 2009). Namun, masih belum jelas

jika suplementasi IGF1 meningkatkan produksi blastokista. Kami mengidentifikasi 25 penelitian yang diterbitkan yang meneliti efek suplementasi IGF1 pada embrio sapi IVP (Herrler dkk., 1992; Larson dkk., 1992a;Banjir dkk., 1993;Lee dan Fukui, 1995;Matsui dkk., 1995;Palma dkk., 1997;Prelle dkk., 2001;Byrne dkk., 2002; Makarevich dan Markkula, 2002; Moreira dkk., 2002;Blok dkk., 2003, 2008;Sirisathien dan Brackett, 2003;Sirisathien dkk., 2003b; Jousan dan Hansen, 2004,2007;Dhali dkk., 2009;Loureiro dkk., 2009;Moss dkk., 2009;Neira dkk., 2010;Bonilla dkk., 2011b; Sakagami dkk., 2012;Ahumada dkk., 2013;Kocyigit dan Cevik, 2015; Xie dkk., 2017;Tribulo dkk., 2018a;Stoecklein dkk., 2021). Sekitar setengah dari penelitian ini mendeteksi peningkatan pembentukan blastokista setelah suplementasi IGF1. Beberapa penelitian juga menunjukkan manfaat IGF1 pada jumlah sel total (Tabel 1). IGF1 menggunakan protein kinase yang diaktifkan mitogen (**PETA**) jalur untuk meningkatkan jumlah sel blastokista (Jousan dan Hansen, 2007). Tipe sel spesifik yang dipengaruhi oleh IGF1 masih belum jelas. Satu laporan mengimplikasikan massa sel bagian dalam (**ICM**) sebagai tipe sel utama yang dipengaruhi oleh IGF1 (Sirisathien dan Brackett, 2003) sementara penelitian lain menemukan bahwa**TE**adalah sel utama yang merespons IGF1(Xie dkk., 2017) dan penelitian ketiga menemukan bahwa jumlah sel ICM dan TE ditingkatkan dengan suplementasi IGF1 (Sakagami dkk., 2012).

Manfaat terbesar IGF1 pada embrio sapi dapat dikatakan terjadi selama periode stres. Terdapat bukti bahwa IGF1 berfungsi sebagai faktor anti-apoptosis dan kelangsungan hidup pada embrio sapi IVP dalam kondisi kultur embrio normal (Byrne dkk., 2002;Makarevich dan Markkula, 2002), dan IGF1 meringankan spesies oksigen reaktif (**ROS**) kerusakan pada blastokista sapi (Moss dkk., 2009). Selain itu, IGF1 mengurangi efek buruk dari sengatan panas pada apoptosis dan jumlah sel blastokista (Jousan dan Hansen, 2004;Jousan dkk., 2008). Efek ini dikendalikan melalui aktivasi IGF1 pada jalur PI3 kinase (Jousan dan Hansen, 2007;Jousan dkk., 2008;Bonilla dkk., 2011a). Dengan demikian, terdapat bukti jelas bahwa IGF1 dapat berfungsi sebagai faktor termoprotektif pada embrio sapi, dan salah satu aktivitas utamanya adalah membatasi kerusakan ROS.

Beberapa penelitian telah meneliti hasil pasca transfer dari embrio yang diobati dengan IGF1. Pengobatan dengan IGF1 sebelum transfer dapat meningkatkan kelangsungan hidup konseptus pada hari ke 14 pasca estrus (Blok dkk., 2007), namun peningkatan tingkat retensi kehamilan setelah ET hanya dapat dideteksi ketika ET selesai pada bulan-bulan musim panas (Blok dkk., 2003; Loureiro dkk., 2009). Hal ini menambah kepercayaan terhadap anggapan bahwa IGF1 berfungsi sebagai faktor kelangsungan hidup pada embrio IVP sapi.

Efek suplementasi IGF2 pada embrio sapi IVP masih kurang diteliti.Byrne dkk. (2002) menemukan bahwa penambahan media pada 1 atau 100 ng/mL IGF2 meningkatkan perkembangan blastokista hari ke 7 dan jumlah sel, namun anehnya pengobatan 10 ng/mL tidak mempengaruhi perkembangan blastokista. Dua kelompok lainnya tidak dapat mendeteksi efek positif suplementasi IGF2 terhadap perkembangan blastokista sapi (Banjir dkk., 1993;Neira dkk., 2010).

Keluarga dan Inhibitor WNT

Situs integrasi terkait Wingless (**tidak**) keluarga adalah kelompok glikolipoprotein yang dilestarikan secara evolusioner yang terlibat dalam banyak proses perkembangan penting dan mendasar, termasuk proliferasi dan diferensiasi sel induk serta penentuan sumbu tubuh (Steinhart dan Angers, 2018). Pensinyalan melalui WNT melibatkan beberapa reseptor dan koreseptor yang mengandung sistem pensinyalan kanonik (bergantung pada ß-catenin) dan/atau non-kanonik (tidak bergantung pada ß-catenin) (Niehrs, 2012). Jalur ini dikendalikan secara intraseluler oleh fosforilasi protein dan secara ekstraseluler oleh antagonis, termasuk penghambat jalur sinyal Dickkopf WNT 1 (**DKK1**).

Tabel 1. Embriokin dengan pengaruh yang diketahui terhadap jumlah sel blastokista sapi dan hasil kehamilan pasca transfer.

embrio	Nomor handphone	Hasil kehamilan	Referensi
DKK1	^Rasio ICM:TE	^Tingkat kehamilan ↓Berat lahir anak sapi	Denikol dkk. (2014),Tribulo dkk. (2017a)
FST	^Total	tidak	Lee dkk. (2009),Zhenhua dkk. (2017),Rajput dkk. (2020)
IL6	^ICM ^Rasio ICM:TE	^Perkembangan embrio dan janin	Wooldridge dan Ealy (2019),Woolridge dkk. (2019),Seekford dkk. (2021)
CSF2	^ICM ^Rasio ICM:TE	↓Keguguran saat hamil ^Tingkat kehamilan	Loureiro dkk. (2009).Denikol dkk. (2014)
HIDUP	^atau↓Total	tidak	Fukui dan Matsuyama (1994),Vejlsted dkk. (2005),Kocyigit dan Cevik (2015)
IGF1	^Total	^Tingkat kehamilan dan tingkat melahirkan selama bulan-bulan musim panas	Matsui dkk. (1995),Byrne dkk. (2002),Moreira dkk. (2002),Blok dkk. (2003),Sirisathien dan Brackett (2003),Sirisathien dkk. (2003a), Jousan dan Hansen (2007),Sakagami dkk. (2012);Xie dkk. (2017)
HDGF	^Total	Tidak ada efek	Gomez dkk. (2014,2017)
TDGF	^Total	tidak	Kannampuzha-Francis dkk. (2017)
GH	^Total	Tidak ada efek	Kolle dkk. (2002).Moreira dkk. (2002),Iwata dkk. (2003)
MT	^Total	tidak	Wang dkk. (2014a,B),Pang dkk. (2016) Rodriguez dkk.
Retinoid	^atau tidak berpengaruh pada ICM ^atau↓TE	tidak	(2007b),Gomez dkk. (2008)

ND, tidak ditentukan.

Anggota Keluarga WNT 7A dan 11

Pekerjaan pembuatan profil ekspresi global telah mengidentifikasi ekspresi beberapa WNT dan berbagai reseptor, koreseptor, dan inhibitor pada embrio sapi (Denikol dkk., 2013;Tribulo dkk., 2017c). Selain itu, WNT7A diproduksi oleh endometrium sapi, tetapi tidak diproduksi oleh embrio praimplantasi (Denikol dkk., 2013;Tribulo dkk., 2017c, 2018b). Sampai saat ini, hanya WNT7A dan WNT11 yang telah ditambahkan ke embrio sapi IVP, dengan masing-masing ligan meningkatkan pembentukan blastokista pada hari ke 7 pascafertilisasi. Namun, tidak ada yang mempengaruhi jumlah sel blastokista (Tribulo dkk., 2017c, 2018a). Penelitian di masa depan diperlukan untuk menentukan apakah suplementasi WNT7A dan/atau WNT11 akan meningkatkan retensi kehamilan dan tingkat melahirkan setelah ET.

DKK1

Jalur WNT kanonik tidak diperlukan untuk perkembangan embrio ke tahap blastokista pada embrio tikus, babi, dan sapi (Huelsken dkk., 2000;Xie dkk., 2008; Biechele dkk., 2013;Denikol dkk., 2013; Lim dkk., 2013), namun ada keterlibatan yang menarik dari DKK1, penghambat sinyal WNT kanonik, dalam perkembangan embrio IVP. Suplementasi dengan DKK1 tidak mempengaruhi perkembangan blastokista (Denikol dkk., 2013, 2014;Tribulo dkk., 2017a, 2017b, 2019). Namun, suplementasi DKK mengubah komposisi garis keturunan sel embrio dalam blastokista (Tabel 1; Denikol dkk., 2014). Secara khusus, DKK1 mendukung munculnya endoderm primitif (**Pra**) sel, subpopulasi sel ICM yang akan membentuk hipoblas dan akhirnya kantung kuning telur (Denikol dkk., 2014). Selain itu, suplementasi DKK1 dari hari ke 5 hingga 7,5 menghasilkan konsepsi hari ke 15 yang lebih lama (Tribulo dkk., 2019) dan peningkatan angka retensi kehamilan pada hari ke 32 tetapi tidak pada hari ke 64 hingga 76 (Tabel 1;Denikol dkk., 2014;Tribulo dkk., 2017a). Tingkat kelahiran anak tidak terpengaruh oleh pengobatan DKK1 sebelum ET, namun penurunan berat lahir anak sapi terdeteksi dari anak sapi yang dihasilkan dari embrio IVP yang ditambah DKK1 (Tribulo dkk., 2017a). Temuan terakhir ini mungkin mempunyai implikasi praktis karena sebagian dari IVP yang ditransfer menghasilkan anak sapi yang lebih berat daripada yang biasanya diamati setelah pembiakan melalui inseminasi buatan (**AI**; Farin dan Farin, 1995;Farin dkk., 2006;Bonilla dkk., 2014).

Mengubah Faktor Pertumbuhan-βKeluarga super

Bagian ini menjelaskan aktivitas beberapa anggota faktor pertumbuhan transformasi β (**TGFB**) keluarga super. Lebih dari 30 anggota ada di keluarga super ini (Lorda-Diez dkk., 2022). Subfamili yang menarik dalam diskusi ini meliputi TGFB1, aktivin, faktor pertumbuhan dan diferensiasi, dan protein morfogenik tulang (**BMP**). Faktor-faktor ini adalah glikoprotein homo- dan hetero-dimerik yang bertindak secara lokal atau sistemik tergantung pada faktor spesifik (Pijat, 2012;Wang dkk., 2014c). Molekul sinyal hilir yang diatur oleh anggota keluarga TGFB bervariasi; namun, mereka terkenal karena mengaktifkan ibu kecil melawan decapentaplegic (**SMAD**) keluarga transduser sinyal (Pijat, 2012;Wang dkk., 2014c;Zhang dkk., 2015;Rajput dkk., 2020).

Terdapat bukti bahwa molekul TGFB yang diturunkan dari embrio dapat mempengaruhi embriogenesis selama kultur. Menghambat aktivitas SMAD baik secara farmakologis atau dengan ekspresi berlebih dari molekul penghambat SMAD akan menurunkan perkembangan blastokista in vitro (Rajput dkk., 2020). Begitu pula dengan melengkapi kultur embrio dengan Noggin, yang menyerap berbagai molekul TGFB, mengurangi pembentukan blastokista (Tabel Tambahan S1;La Rosa dkk., 2011;Rajput dkk., 2020). Berbagai inhibitor ini juga mengurangi jumlah sel TE pada blastokista pada beberapa penelitian, namun tidak pada semua penelitian (La Rosa dkk., 2011; Rajput dkk., 2020). Identitas molekul TGFB spesifik yang dihasilkan embrio yang secara positif mempengaruhi perkembangan embrio IVP masih belum jelas, namun beberapa kandidat molekul telah dipelajari yang akan dibahas lebih mendalam.

Transformasi Faktor Pertumbuhan-β

Ada 3 *TGFB* gen pada sapi (*TGFB1*, *TGFB2*, Dan *TGFB3*) tetapi sejauh ini hanya TGFB1 yang telah diuji sebagai embrio. Transkrip untuk *TGFB1* ada di endometrium sapi (Tribulo dkk., 2018b; Ibrahim dkk., 2019) dan kedua subunit reseptor TGFB1 diekspresikan oleh embrio praimplantasi sapi (Roelen dkk., 1998;Barrera dkk., 2018). Hanya 2 dari 6 penelitian yang mengamati manfaat suplementasi TGFB1 pada pembentukan blastokista, dan tidak ada satu pun penelitian yang mendeteksi efek positif TGFB1 pada jumlah sel blastokista (Banjir dkk., 1993;Yang dkk., 1993;Keefer dkk., 1994; Lee dan Fukui, 1995;Neira dkk., 2010;Barrera dkk., 2018). Belum ada penelitian yang meneliti apakah suplementasi TGFB1 mempengaruhi hasil kehamilan.

Aktivasi

Aktivin terkenal karena keterlibatannya dalam mengatur sumbu hipotalamus-hipofisis-gonad, namun mereka juga mempunyai efek terhadap sel dan jaringan lain termasuk embrio sapi (Namwanje dan Brown, 2016). Transkrip untuk subunit alfa aktivin, yang menghasilkan kompleks aktivin A, terdapat di saluran telur dan embrio sapi dari tahap oosit hingga morula (Gandolfi dkk., 1995;Yoshioka dkk., 1998). Subunit reseptor aktivin juga diekspresikan dalam embrio sapi (Yoshioka dkk., 1998).

Peningkatan yang konsisten dalam perkembangan blastokista telah dicatat setelah pemberian aktivin A (**ACTA**) suplementasi (Tabel Tambahan S1;Yoshioka dan Kamomae, 1996;Lee dkk., 2009;Taman dkk., 2010;Trigal dkk., 2011; Kannampuzha-Francis dkk., 2017;Tribulo dkk., 2018a), namun efek ACTA pada jumlah sel blastokista masih kurang pasti. Beberapa kelompok gagal mendeteksi efek menguntungkan dari ACTA pada jumlah sel (Yoshioka dan Kamomae, 1996;Taman dkk., 2010;Kannampuzha-Francis dkk., 2017), tetapi satu laporan mengidentifikasi peningkatan jumlah sel TE setelah pengobatan ACTA (Trigal dkk., 2011). Belum ada penelitian yang dilakukan untuk mengeksplorasi apakah suplementasi ACTA mempengaruhi hasil kehamilan pasca transfer, namun semua indikasi menunjukkan bahwa ACTA dapat digunakan sebagai suplemen medium untuk meningkatkan laju pembentukan blastokista dalam sistem IVF.

Protein Morfogenetik Tulang

Anggota keluarga TGFB ini terkenal karena keterlibatannya dalam pembentukan tulang dan perkembangan banyak organ dan jaringan lainnya (Wang dkk., 2014c). Transkrip untuk BMP2, 3, 7, dan 10 serta beberapa subunit reseptornya telah terdeteksi pada embrio sapi (Jiang dkk., 2014; Lee dkk., 2014). BMP ini dan BMP lainnya juga diekspresikan di saluran telur dan rahim selama awal kebuntingan pada sapi (Garcia dkk., 2014;Jiang dkk., 2014;Lee dkk., 2014; Tribulo dkk., 2018b).

Studi suplementasi superfamili BMP yang terbatas telah diselesaikan, sehingga sulit untuk menyimpulkan apakah pasti

BMP menjanjikan sebagai embrio. Ada satu laporan yang menggambarkan peningkatan pembentukan blastokista setelah suplementasi BMP5 dari hari 1 hingga 2 pasca pembuahan (Tabel Tambahan S1;Garcia dkk., 2015). Penelitian lain menemukan bahwa suplementasi BMP2 tidak efektif dalam mempengaruhi pembentukan blastokista pada embrio sapi (Lee dkk., 2014). Suplementasi BMP4 menurunkan pembentukan blastokista tetapi tidak mempengaruhi jumlah sel blastokista (Tabel Tambahan S1;La Rosa dkk., 2011). Juga, terdapat bukti bahwa BMP4 mengurangi proliferasi TE dan BMP2 dan BMP4 mengurangi ekspresi interferon-tau (Pennington dan Ealy, 2012). Oleh karena itu, tidak ada bukti kuat yang mencantumkan BMP sebagai embrio pada sapi.

Follistatin

Follistatin (**FST**) adalah antagonis superfamili TGFB1 yang mengandung banyak aktivitas di seluruh tubuh (Phillips dan de Kretser, 1998). Obat ini mendapatkan namanya karena awalnya diisolasi dari cairan folikel dan ditemukan menghambat sekresi hormon perangsang folikel oleh hipofisis anterior (Phillips dan de Kretser, 1998;Rajput dkk., 2020). Transkrip FST telah terdeteksi pada endometrium sapi, tetapi tidak pada embrio sapi (Killeen dkk., 2014). Suplementasi 1-10 ng/mL FST pada embrio sapi meningkatkan pembentukan blastokista dan meningkatkan jumlah sel TE (Lee dkk., 2009;Zhang dkk., 2015;Zhenhua dkk., 2017;Ashry dkk., 2018a;Rajput dkk., 2020). Mekanisme kerja FST masih belum jelas, namun FST tidak mengganggu aktivitas aktivin di dalam embrio (Lee dkk., 2009). Sebaliknya, tampaknya menyadarkan transformasi strain SMAD dan Ak (**AKT**) sistem persinyalan sehingga mereka lebih responsif terhadap aktivin dan kemungkinan anggota superfamili TGFB lainnya (Ashry dkk., 2018b;Rajput dkk., 2020). Belum ada penelitian yang menyelidiki apakah pengobatan FST sebelum ET akan meningkatkan tingkat retensi kehamilan dan kesehatan anak sapi neonatal.

Sitokin

Sitokin adalah hormon yang awalnya diidentifikasi sebagai pengatur sistem kekebalan tubuh, namun beberapa sitokin juga bekerja pada sel lain di seluruh tubuh, termasuk embrio. Ada beberapa famili sitokin, dan famili ini mencakup berbagai interleukin (**sakit**), interferon (**JIKA**), faktor perangsang koloni (**CSF**), mengubah faktor pertumbuhan (**TGF**), dan faktor nekrosis tumor (**TNF**). Beberapa anggota di beberapa keluarga ini telah diperiksa kemampuan embriotrofiknya.

Faktor Perangsang Koloni 2

Faktor perangsang koloni 2 (**CSF2**), yang juga disebut sebagai CSF granulosit-makrofag, termasuk dalam keluarga sitokin β-umum (Dougan dkk., 2019). Keluarga sitokin ini juga mengandung**sakit**3 dan 5. Ketiga sitokin ini diklasifikasikan bersama karena menggunakan reseptor subunit β yang sama. Reseptor CSF2 adalah struktur heterodimerik yang terdiri dari 2 rantai β-umum (disebut**CSF2RB**) dan 2 subunit α spesifik CSF2 (disebut**CSF2RA**;Dougan dkk., 2019). Pengikatan dan aktivasi reseptor menstimulasi berbagai molekul pemberi sinyal intraseluler termasuk kinase keluarga SRC, kinase teraktivasi janus (**JAK**) 2, transduser sinyal dan aktivator transkripsi (**STAT**) 5, fosfoinositida 3-kinase (**PI3K**), dan MAPK (Becher dkk., 2016). CSF2 diproduksi oleh saluran telur dan rahim selama awal kehamilan (de Moraes dkk., 1997;Becher dkk., 2016;Tribulo dkk., 2018b). CSF2 mempengaruhi perkembangan embrio sapi, namun anehnya, ekspresi CSFRA tidak dapat dideteksi pada embrio pra-implantasi sapi (Jiang dkk., 2014). Hal ini menarik karena embrio sapi responsif terhadap suplementasi CSF2 (lihat di bawah).

Studi kultur embrio awal dengan CSF2 sapi rekombinan (1997–2010) menunjukkan bahwa CSF2 meningkatkan perkembangan blastokista (de Moraes dkk., 1997;Loureiro dkk., 2009; Neira dkk., 2010), namun penelitian yang lebih baru tidak menemukan efek yang konsisten dari CSF2 terhadap perkembangan blastokista (Hickman dkk., 2011;Dobbs dkk., 2013a;Tribulo dkk., 2017a;Zolini dkk., 2020). Hal ini mungkin mencerminkan perbedaan yang disebabkan oleh persiapan protein rekombinan. Pekerjaan awal CSF2 menggunakan persiapan CSF2 dari Ciba-Geigy (Basal, Swiss). sedangkan penelitian selanjutnya menggunakan sediaan protein rekombinan dari perusahaan lain.

Mungkin ada ketergantungan jenis kelamin yang terkait dengan aktivitas CSF2. Satu laporan mengamati CSF2 meningkatkan pembentukan blastokista pada embrio wanita tetapi tidak pada embrio pria (Siqueira dan Hansen, 2016). Namun, laporan lain tidak menemukan pengaruh CSF2 dan jenis kelamin dalam pembentukan blastokista setelah blastokista menjalani vitrifikasi (Sosa dkk., 2020). Kebanyakan penelitian CSF2 gagal mendeteksi perubahan jumlah sel, namun ada beberapa indikasi bahwa CSF2 dapat meningkatkan jumlah sel ICM (Tabel 1;Loureiro dkk., 2009;Hickman dkk., 2011). Tidak ada ketergantungan jenis kelamin yang jelas terhadap efek ini (Siqueira dan Hansen, 2016). Ada juga beberapa bukti yang menunjukkan bahwa CSF2 berfungsi sebagai agen pro-survival dengan ICM (Dobbs dkk., 2013a) dan mendorong pemanjangan konseptus peri-implantasi (Loureiro dkk., 2011), tetapi tampaknya tidak memiliki efek apa pun terhadap kualitas blastokista secara keseluruhan ketika menilai apoptosis, interferon-tau (**JIKA**) sekresi, status metilasi DNA, dan laju pembentukan pertumbuhan TE (Loureiro dkk., 2009;Hickman dkk., 2011;Dobbs dkk., 2013a, 2013b).

Bisa dibilang, hasil yang paling menarik dari suplementasi CSF2 pada embrio IVP adalah melihat manfaatnya pada angka kehamilan pasca transfer (Tabel 1). Dalam sebuah laporan, ET embrio yang diobati dengan CSF selama bulan-bulan musim panas pada sapi perah menyusui tidak mempengaruhi tingkat kebuntingan pada diagnosis pertama (hari ke 30-35), namun lebih sedikit kehamilan yang hilang pada penerima yang menerima embrio yang diobati dengan CSF2 (Loureiro dkk., 2009).Sebuah studi lanjutan yang diselesaikan pada bulan-bulan musim dingin mendeteksi peningkatan angka kehamilan pada hari ke 30 hingga 35 dan saat melahirkan (Loureiro dkk., 2009). Laporan kedua mendeteksi peningkatan angka kehamilan pada hari ke 32, namun keguguran setelah diagnosis awal mencegah deteksi efek CSF2 pada angka melahirkan (Denikol dkk., 2014). Dua laporan lainnya gagal mendeteksi manfaat suplementasi CSF2 terhadap angka kehamilan pasca transfer (Tribulo dkk., 2017a;Zolini dkk., 2020); meskipun salah satu penelitian ini berisi terlalu sedikit transfer untuk menilai hasil kehamilan secara memadai (Zolini dkk., 2020). Sebaliknya, penelitian tersebut dirancang untuk mengeksplorasi bagaimana profil transkrip dapat mempengaruhi pemeliharaan kehamilan. Terakhir, ada satu laporan yang menyatakan bahwa pengobatan CSF2 pada embrio sebelum ET dapat meningkatkan kesehatan anak sapi pada masa neonatal dan pascanatal (Kannampuzha-Francis dkk., 2015). Sedikit penurunan pada bayi lahir mati dan peningkatan laju pertumbuhan pascakelahiran terlihat pada kehamilan yang dihasilkan dari embrio yang diobati dengan CSF2. Secara kolektif, pengamatan ini memberikan bukti yang meyakinkan bahwa CSF2 dapat meningkatkan retensi kehamilan dan kesehatan anak sapi pasca melahirkan dalam kondisi tertentu. Akan sangat menarik untuk mengeksplorasi mekanisme mendasar yang digunakan oleh CSF2 untuk menghasilkan hasil yang bermanfaat sehingga mekanisme tersebut dapat ditargetkan pada embrio sapi sebelum ET.

Interleukin 3 dan 5

Eksplorasi anggota lain dari keluarga sitokin β-umum (IL3, IL5) sebagai embriokin masih belum lengkap. Satu studi gagal mendeteksi efek positif IL3 pada tingkat pembelahan atau blastokista pada embrio IVP sapi (Al Naib dkk., 2011). Belum ada penelitian yang menyelidiki apakah IL5 bekerja pada embrio sapi.

Faktor Penghambat Leukemia

Faktor penghambat leukemia (**HIDUP**) adalah anggota keluarga sitokin IL6. Keluarga ini juga mencakup IL6, IL11, IL27, IL31, LIF, oncostatin-M (**OSM**), dan faktor neurotropik siliaris (**CNTF**) (Eulenfeld dkk., 2012;Rose-John, 2018). Setiap anggota keluarga IL6 berikatan dengan kompleks reseptor yang terdiri dari reseptor subunit α spesifik ligan (misalnya, reseptor LIF).**LIFR**] dan reseptor IL6 [**IL6R**]) dan subunit β yang umum, disebut transduser sinyal IL6 (**IL6ST**, juga dikenal sebagai gp130). Anggota keluarga menggunakan subunit IL6ST untuk mengontrol beberapa jalur transduksi sinyal, terutama JAK1/2, STAT3, MAPK, PI3K, dan faktor nuklir-kappa B (**NFkB**;Rose-John, 2018; Nicola dan Babon, 2015). Transkrip untuk*IL6ST*dapat dideteksi dari tahap satu sel hingga blastokista pada embrio sapi, namun masih belum jelas apakah hal tersebut dapat dideteksi*LIFR* diekspresikan dalam embrio sapi (Wooldridge dan Ealy, 2019; Wooldridge dkk., 2019).Eckert dan Niemann (1998)melaporkan itu *LIFR*transkrip hanya dapat dideteksi pada embrio sapi IVP dan tidak ada pada embrio yang diproduksi secara in vivo. Laboratorium kami menemukan bahwa kelimpahan relatif*LIFR*mRNA sangat rendah pada blastokista sapi IVP (Wooldridge dkk., 2019).

Tidak jelas apakah suplementasi LIF mempengaruhi perkembangan embrio IVP sapi. Beberapa kelompok telah melaporkan manfaat suplementasi LIF rekombinan manusia atau tikus terhadap laju pembentukan blastokista (Neira dkk., 2010; Kocyigit dan Cevik, 2015,2017), sedangkan kelompok lain tidak mendeteksi manfaat apa pun atau mengamati penurunan perkembangan blastokista setelah pemberian suplemen LIF rekombinan manusia (Fukui dan Matsuyama, 1994;Sirisathien dkk., 2003a;Vejlsted dkk., 2005;Rodriguez dkk., 2007a). Perbedaan serupa telah dijelaskan dalam efektivitas LIF untuk mempengaruhi jumlah sel embrio dan berfungsi sebagai agen cryo-survival (Fukui dan Matsuyama, 1994;Sirisathien dkk., 2003a;Vejlsted dkk., 2005; Rodriguez dkk., 2007a;Kocyigit dan Cevik, 2015, 2017). Beberapa dan mungkin sebagian besar dari variasi respons ini mungkin terjadi karena beragamnya konsentrasi LIF yang digunakan dalam penelitian ini (500–6.000 IU [2–100 ng/mL]) atau karena penggunaan formulasi media yang berbeda dan berbagai disparitas protokol lainnya. Namun mengingat jumlahnya yang sedikit*LIFR*dalam embrio IVP dan potensi tidak adanya*LIFR*dalam embrio yang dihasilkan secara in vivo, tampak bahwa LIF tidak berfungsi sebagai embriokin hingga tahap perkembangan blastokista pada sapi. Meskipun demikian, suplementasi LIF akan meningkatkan populasi sel ICM yang mewakili**Pra**pada hari ke 9 sampai 10 pasca pembuahan (Wooldridge dan Ealy, 2021b). Sel-sel ini berpartisipasi dalam perkembangan kantung kuning telur, menunjukkan bahwa LIF dapat mempengaruhi perkembangan struktur ini. Namun, diperlukan lebih banyak penelitian untuk mengeksplorasi apakah LIF dapat berfungsi dengan cara ini atau cara lain ketika blastokista bertransisi menjadi struktur yang mengandung banyak lapisan kuman dan beberapa membran ekstraembrionik.

Interleukin-6

Interleukin-6 (**IL6**) paling dikenal karena perannya dalam merangsang respons fase akut pada kekebalan bawaan tanggapan (Eulenfeld dkk., 2012); namun, ia terlibat dalam banyak proses biologis. Embrio sapi menghasilkan transkrip untuk*IL6*dan reseptor subunit α spesifik IL6*IL6R* (Wooldridge dan Ealy, 2019;Wooldridge dkk., 2019). Nyatanya, *IL6*Dan*IL6R* adalah ligan anggota keluarga IL6 dan reseptor subunit α yang paling banyak ditemukan pada blastokista sapi (Wooldridge dkk., 2019). Transkrip untuk*IL6* hadir dalam endometrium sapi (Tribulo dkk., 2018b). Berbagai molekul pemberi sinyal intraseluler dikendalikan oleh IL6 dan penelitian terbaru mengidentifikasi bahwa IL6 dapat mengaktifkan STAT3 pada embrio sapi antara tahap sel 8 dan 16 dan blastokista (Wooldridge dkk., 2019;Wooldridge dan Ealy, 2021a).

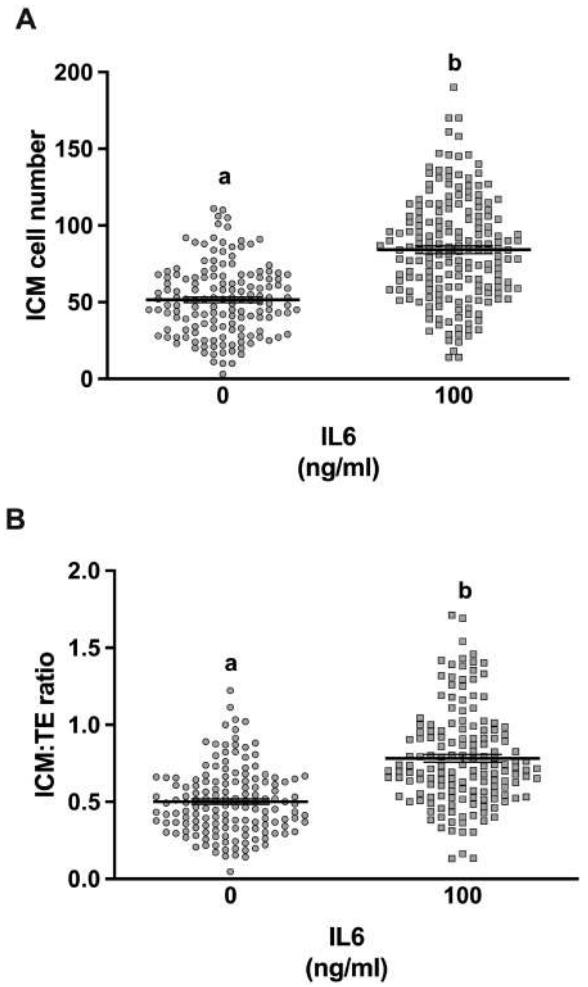
Suplementasi IL6 sapi rekombinan (1–200 ng/mL) tidak mempengaruhi perkembangan embrio IVP ketika embrio dikultur dalam kelompok (Wooldridge dan Ealy, 2019;Wooldridge dkk., 2019;Sang dkk., 2020). Namun, suplementasi IL6 (100 ng/mL) memang meningkatkan perkembangan embrio sapi ketika zigot dikultur secara individual (Wooldridge dan Ealy, 2019). Laboratorium ini menemukan bahwa jumlah sel ICM meningkat setelah pengobatan IL6 pada embrio yang dikultur kelompok (Wooldridge dan Ealy, 2019,2021a;Wooldridge dkk., 2019). Peningkatan numerik dalam jumlah sel ICM dapat dideteksi pada 1 dan 10 ng/mL IL6 tetapi 100 ng/mL memberikan peningkatan paling konsisten dalam jumlah sel ICM (Wooldridge dan Ealy, 2019;Tabel 1;Gambar 1). Penelitian terbaru juga menemukan bahwa suplementasi IL6 meningkatkan jumlah sel PrE dalam hari ke 9/10 blastokista sapi (Wooldridge dan Ealy, 2021a), namun diperlukan lebih banyak upaya untuk mengeksplorasi pentingnya temuan ini. Kelompok lain gagal mendeteksi peningkatan jumlah sel ICM setelah pengobatan IL6 (Sang dkk., 2020). Tidak jelas mengapa hasil yang berbeda dicatat oleh laboratorium yang berbeda, namun laboratorium tersebut menggunakan konsentrasi IL6 sebesar 50 ng/mL, yang mungkin tidak ideal untuk mendeteksi perubahan jumlah sel ICM.

Mekanisme kerja IL6 pada ICM masih dieksplorasi. Pensinyalan STAT3 diperlukan untuk aktivitas IL6 pada sel ICM, namun masih belum jelas apakah ini adalah molekul pensinyalan spesifik yang digunakan oleh IL6 untuk melakukan aksinya (Wooldridge dkk., 2019; Wooldridge dan Ealy, 2021a). Selain itu, IL6 tidak mempengaruhi jumlah sel pada tahap morula, dan efek positif dari IL6 tidak muncul sampai ICM definitif terbentuk (Wooldridge dkk., 2019). Dengan demikian, IL6 kemungkinan menstimulasi proliferasi sel ICM atau menghambat apoptosis sel ICM.

Sebuah studi baru-baru ini mengeksplorasi apakah pengobatan IL6 akan meningkatkan hasil kebuntingan pasca transfer pada sapi (Tabel 1; Seekford dkk., 2021). Penelitian ini menemukan bahwa perkembangan embrio dan janin antara hari ke 28 dan 70 kehamilan diubah pada kehamilan akibat blastokista yang diobati dengan IL6. Menariknya, hal ini lebih mirip dengan lintasan perkembangan kehamilan yang dihasilkan oleh AI dibandingkan dengan kehamilan yang dihasilkan dari embrio IVP yang tidak diobati. Kehamilan tidak diikuti hingga cukup bulan, dan jumlah penerima terlalu rendah untuk menguji secara akurat apakah IL6 mempengaruhi tingkat retensi kehamilan, namun ada peningkatan numerik dalam retensi kehamilan pada embrio yang diobati dengan IL6 (42% berbanding 26% untuk embrio kontrol IVP).

Sitokin lainnya

Interleukin-1ß (**IL1B**), faktor nekrosis tumor-α (**TNFA**), dan faktor sel induk (**SCF**, alias Ligan Kit) juga telah diperiksa sebagai embrio potensial pada embrio sapi IVP.



Gambar 1. Contoh bagaimana suplementasi IL6 meningkatkan jumlah sel ICM dan rasio sel ICM:TE pada blastokista sapi IVP. Titik data ini mewakili jumlah sel blastokista setelah pewarnaan sel diferensial untuk CDX2 (penanda TE) dan DAPI (penanda DNA). Panel A menunjukkan nomor sel ICM dan Panel B menunjukkan rasio ICM-TE dari 5 studi independen. Setiap titik data pada kedua gambar mewakili satu blastokista (*N*=151 untuk kelompok kontrol dan 156 untuk kelompok yang diberi IL6). Rata-rata keseluruhan dan SEM ditunjukkan dengan batang. Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan (*P*<0,05). Grafik ini diambil dengan izin dariWooldridge dan Ealy (2019).

Reseptor untuk masing-masing sitokin ini telah terdeteksi pada embrio sapi (Jiang dkk., 2014;Dinarello, 2018). Transkrip untuk*IL1B*Dan*SCF*telah terdeteksi di endometrium sapi dan*IL1B*transkrip telah terdeteksi pada embrio sapi (Correia-Alvarez dkk., 2015;Lupicka dkk., 2015).

Efek positif dari suplementasi IL1B pada perkembangan IVP sapi telah dicatat, namun hanya ketika embrio dikultur dalam kelompok besar (25-30 zigot/50 µL tetes;Paula-Lopes dkk., 1998). Salah satu spekulasi mengenai aktivitas aneh ini adalah bahwa IL1B berfungsi secara tidak langsung, yaitu menstimulasi embrio yang berasal dari embrio yang harus diproduksi dari sejumlah besar embrio untuk mencapai konsentrasi yang efektif.

Hanya satu penelitian yang menyelidiki peran SCF selama kultur embrio IVP sapi, dan penelitian tersebut gagal mendeteksi adanya perbaikan dalam perkembangan blastokista setelah suplementasi dengan 50 ng/mL SCF (Dhali dkk., 2009). Namun, penyelidikan lebih lanjut terhadap SCF sebagai embriokin tampaknya diperlukan mengingat c-Kit terdapat pada embrio sapi dan SCF secara istimewa bekerja pada sel induk di bagian lain tubuh.

Terakhir, tidak ada indikasi bahwa TNF diproduksi oleh endometrium atau embrio sapi dalam kondisi normal. Selain itu, suplementasi TNF mengurangi perkembangan embrio IVP (Jackson dkk., 2012). Hal ini menunjukkan bahwa TNF mungkin berfungsi sebagai penjaga kondisi ketika perkembangan embrio dapat menimbulkan akibat yang berbahaya, termasuk kondisi di mana keguguran bisa sangat besar dan saat kehamilan dapat berkontribusi terhadap peningkatan keparahan suatu penyakit.

Faktor Pertumbuhan

Faktor Pertumbuhan Fibroblas

Faktor pertumbuhan fibroblas (**FGF**) superfamili terdiri dari setidaknya 18 ligan dan 4 subtipe reseptor primer (**FGFR**) pada mamalia (Ornitz dan Itoh, 2015). FGF ini terlibat dalam beberapa proses perkembangan, yang paling penting dalam tinjauan ini adalah pengendalian FGF terhadap perkembangan hipoblas pada tikus dan sapi (Cockburn dan Rossant, 2010;Yamanaka dkk., 2010). Spesifisitas pengikatan FGF ke FGFR diatur oleh beberapa faktor, termasuk pembentukan variasi gabungan di daerah pengikatan ligan dan hubungan dengan faktor pendamping FGFR, terutama heparin dan Klotho (Ornitz dan Itoh, 2015). Beberapa FGF dan keempat FGFR diekspresikan oleh embrio sapi (Cooke dkk., 2009;Ozawa dkk., 2013). Menariknya, FGFR2 dan 4 terlokalisasi secara eksklusif pada TE, sedangkan FGFR1 dan 3 terletak di dalam ICM dan TE pada blastokista sapi (Ozawa dkk., 2013).

Faktor pertumbuhan fibroblas 2 merupakan FGF yang paling baik dipelajari pada embrio sapi. Sebagian besar penelitian menemukan bahwa suplementasi FGF2 (0,05–50 ng/mL) tidak berpengaruh pada perkembangan blastokista (Larson dkk., 1992b;Banjir dkk., 1993;Lee dan Fukui, 1995;Neira dkk., 2010;Xie dkk., 2017), tetapi penambahan 500 ng/mL segera setelah pembuahan dan lagi pada hari ke-4 pasca pembuahan meningkatkan pembentukan blastokista pada hari ke-7 (Bidang dkk., 2011). FGF2 tambahan tidak melindungi embrio hari ke 5 dari efek negatif sengatan panas (Bidang dkk., 2011). Sebagian besar penelitian gagal mendeteksi perubahan jumlah sel blastokista setelah suplementasi FGF2 (Cooke dkk., 2009;Bidang dkk., 2011;Xie dkk., 2017). Selain itu, suplementasi FGF1 dan 10 tidak berpengaruh pada jumlah sel blastokista (Cooke dkk., 2009).

Meskipun FGF tampaknya tidak memberikan manfaat bagi perkembangan embrio IVP ketika memeriksa laju pembentukan blastokista, terdapat banyak bukti yang menunjukkan bahwa FGF merupakan mediator embriogenesis awal pada sapi. Beberapa FGF (misalnya FGF1, FGF2, dan FGF10) merangsang proliferasi sel TE, migrasi sel, dan produksi interferon-tau (Michael dkk., 2006; Cooke dkk., 2009;Yang dkk., 2011b, 2011c;Xie dkk., 2017). Di ICM, FGF2 dan FGF4 akan merangsang perkembangan endoderm primitif di dalam ICM (Yang dkk., 2011a;Kuijk dkk., 2012). Belum ada penelitian yang dilakukan untuk mengetahui apakah suplementasi FGF sebelum ET akan mempengaruhi retensi kehamilan, fungsi plasenta, atau kecepatan melahirkan.

Faktor Pertumbuhan Epidermal

Faktor pertumbuhan epidermis (**EGF**) milik keluarga ligan yang berfungsi dengan berinteraksi dengan reseptor EGF (**EGFR**;Dreux dkk., 2006). Transkrip untuk EGF telah terdeteksi di saluran telur dan rahim pada sapi (Tribulo dkk.,

2018b) dan pada oosit sapi dan embrio tahap awal (Jiang dkk., 2014). EGFR diekspresikan oleh oosit sapi dan embrio antara tahap sel 1 dan blastokista (Jiang dkk., 2014).

Beberapa kelompok telah meneliti efek EGF pada pembentukan IVP blastokista sapi (Banjir dkk., 1993;Yang dkk., 1993;Keefer dkk., 1994;Lee dan Fukui, 1995;Sirisathien dan Brackett, 2003;Sirisathien dkk., 2003b;Lim dkk., 2007; Lott dkk., 2011;Sakagami dkk., 2012;Ahumada dkk., 2013;Xie dkk., 2017; Pesanalam dkk., 2019;Saeed-Zidane dkk., 2019). Sekitar setengah dari laporan menunjukkan bahwa EGF meningkatkan pembentukan blastokista sementara laporan lain tidak menemukan efek EGF pada perkembangan blastokista. Kebanyakan penelitian gagal mendeteksi perubahan jumlah sel blastokista setelah suplementasi EGF. Sejauh ini belum ada penelitian yang mengamati efek EGF secara individu terhadap retensi kehamilan embrio IVP.

Hormon pertumbuhan

Hormon pertumbuhan (**GH**), juga disebut sebagai somatotropin, terlibat dengan berbagai tindakan yang berkaitan dengan metabolisme, reproduksi, pertumbuhan tulang, dan fungsi fisiologis lainnya (Bergan-Roller dan Sheridan, 2018). Hormon pertumbuhan menggunakan satu reseptor, yang dikenal sebagai reseptor hormon pertumbuhan (**GHR**; Bergan-Roller dan Sheridan, 2018). GHR sangat banyak diekspresikan di hati namun diekspresikan oleh sel-sel lain termasuk embrio praimplantasi sapi (Kolle dkk., 1998;Izadyar dkk., 2000).

Beberapa kelompok telah menguji efek suplementasi GH terhadap produksi IVP blastokista sapi dan jumlah sel (Izadyar dkk., 2000;Kolle dkk., 2002;Moreira dkk., 2002; Iwata dkk., 2003). Setiap laporan menemukan bahwa suplementasi GH meningkatkan pembentukan blastokista dan jumlah sel (Tabel 1). Hanya satu laporan yang meneliti konsekuensi suplementasi GH pasca-transfer (Iwata dkk., 2003), dan tidak ada perbaikan pada tingkat kehamilan pada hari ke 60 kehamilan yang diamati pada kehamilan dari embrio IVP yang diobati dengan GH.

Faktor Pertumbuhan Berasal dari Hepatoma

Faktor pertumbuhan turunan hepatoma (**HDGF**) adalah mediator biogenesis ribosom yang terkenal, pemrosesan RNA, perbaikan kerusakan DNA, regulasi transkripsional, proliferasi dan migrasi sel, dan pengembangan organ (Bao dkk., 2014). Mekanisme pensinyalan HDGF sebagian besar tidak diketahui, tetapi nukleolin (**NCL**) baru-baru ini diidentifikasi sebagai reseptor HDGF (Chen dkk., 2015). Transkrip untuk HDGF telah terdeteksi di dalam endometrium sapi (Munoz dkk., 2012; Gomez dkk., 2014), dan transkrip untuk *HDGF* Dan *NCL* telah terdeteksi pada embrio sapi (Khan dkk., 2016).

Ditemukan dua manuskrip yang mempelajari efek HDGF pada perkembangan embrio sapi IVP.Gomez dkk. (2014,2017) melaporkan bahwa 100 ng/mL HDGF meningkatkan pembentukan blastokista pada hari ke 7 tetapi hanya jika BSA terdapat dalam media kultur (Tabel Tambahan S1). Namun, efek menguntungkan pada perkembangan blastokista tidak terlihat pada hari ke 8. Hal ini menggambarkan bahwa HDGF meningkatkan kecepatan perkembangan blastokista tetapi tidak mempengaruhi laju pembentukan blastokista secara keseluruhan. Selain itu, peningkatan jumlah sel TE terdeteksi pada embrio yang diberi perlakuan HDGF pada blastokista yang dikultur kelompok, namun peningkatan jumlah ICM dan TE hanya diamati ketika HDGF ditambahkan ke embrio yang dikultur secara individual (Tabel 1;Gomez dkk., 2014). Suplementasi HDGF tidak mempengaruhi tingkat kehamilan, tingkat melahirkan, atau berat lahir anak sapi setelah dipindahkan (Gomez dkk., 2017). Oleh karena itu, HDGF tampaknya memiliki efek menguntungkan pada perkembangan embrio sapi IVP. Namun, saat ini belum ada bukti bagaimana hal ini dapat menghasilkan embrio yang lebih kompeten setelah transfer. Terlepas dari itu, perbaikan yang diamati dalam kecepatan perkembangan blastokista IVP dapat mempunyai implikasi positif ketika memilih blastokista yang sedang berkembang untuk ditransfer.

Faktor Pertumbuhan Lainnya

Beberapa faktor pertumbuhan lain telah dieksplorasi sebagai embrio potensial pada embrio sapi IVP. Ini termasuk faktor pertumbuhan jaringan ikat (**CTGF**), faktor pertumbuhan hepatosit (**HGF**), faktor pertumbuhan turunan teratokarsinoma 1 (**TDGF1**), mengubah faktor pertumbuhan-α (**TGFA**), faktor pertumbuhan turunan trombosit (**PDGF**), faktor pertumbuhan saraf (**NGF**), dan faktor pertumbuhan endotel vaskular A (**VEGFA**). Masing-masing hormon ini diekspresikan dalam rahim dan/ atau embrio sapi dan transkrip reseptornya telah terdeteksi pada embrio sapi (Viuff dkk., 1995;Jiang dkk., 2014;Li dkk., 2014;Khan dkk., 2016;Tribulo dkk., 2018b).

Suplementasi dengan CTCF, HGF, TDGF1, PDGF, NGF, TGFA, atau VEGFA tidak mempunyai pengaruh positif terhadap pembentukan blastokista (Larson dkk., 1992b;Banjir dkk., 1993; Luo dkk., 2002;Ahumada dkk., 2013;Kannampuzha-Francis dkk., 2017); meskipun ada satu laporan yang menunjukkan efek menguntungkan TGFA pada pembentukan blastokista (Larson dkk., 1992b). Satu studi menemukan bahwa suplementasi TDGF1 meningkatkan jumlah sel ICM (Tabel 1;Kannampuzha-Francis dkk., 2017).

Steroid

Berbeda dengan protein, relatif sedikit penelitian yang dilakukan mengenai efek hormon steroid yang ditambahkan ke media kultur embrio sapi pasca pembuahan. Kami menemukan beberapa manuskrip yang meneliti efek kortisol, 17β-estradiol (**E2**), dan progesteron (**hal4**) pada produksi embrio IVP sapi. Reseptor untuk masing-masing steroid ini telah terdeteksi pada embrio sapi (Clemente dkk., 2009;Siemieniuch dkk., 2010;Jiang dkk., 2014), dan setiap steroid telah terdeteksi dalam cairan oviduktal selama awal kehamilan (Lamy dkk., 2016). Tak satu pun dari steroid ini mempengaruhi perkembangan embrio IVP (Larson dkk., 2011;Banliat dkk., 2019). Faktanya, suplementasi P4 menurunkan jumlah sel blastokista (Larson dkk., 2011). Efek buruk ini mungkin mencerminkan jumlah P4 yang berlebihan yang diuji ketika membandingkan konsentrasi ini dengan rendahnya jumlah P4 yang bersirkulasi yang mungkin ada selama periode awal embriogenesis. Dalam penelitian lain, pengobatan kortisol menurunkan kelangsungan hidup blastokista setelah kriopreservasi, sedangkan pengobatan P4 meningkatkan kelangsungan hidup setelah kriopreservasi (Banliat dkk., 2019).

Molekul Lainnya

Beberapa hormon tambahan dan faktor-faktor yang disekresikan yang tidak sesuai dengan kategori yang disebutkan sebelumnya telah diperiksa sebagai embriokin potensial. Berikut ini adalah informasi tentang beberapa molekul ini.

Melatonin

Melatonin (**MT**) terkenal karena mengatur ritme sirkadian melalui sekresinya dari kelenjar pineal tetapi memang demikian

juga diekspresikan oleh berbagai jaringan lain, termasuk saluran cerna, yang mengandung aktivitas biologis lainnya (Tordjman dkk., 2017). Melatonin dapat bekerja pada embrio sapi melalui reseptor MT serumpun 1A (**MTNR1A**) dan 1B (**MTNR1B**;Tordjman dkk., 2017). Kedua reseptor tersebut telah terdeteksi pada embrio praimplantasi sapi (Sampaio dkk., 2012;Wang dkk., 2014a). Namun, melatonin juga dapat bertindak sebagai pemulung radikal bebas yang tidak memerlukan reseptornya untuk memberikan efek.

Semua indikasi menunjukkan bahwa melatonin bertindak sebagai embrio pada embrio sapi. Ada beberapa laporan yang menemukan suplementasi melatonin meningkatkan produksi IVP blastokista sapi (Papis dkk., 2007;Wang dkk., 2014a, 2014b, 2016; Marques dkk., 2018). Satu laporan menjelaskan bahwa melatonin meningkatkan pembentukan blastokista ketika embrio dikultur dalam kondisi oksigen tinggi (21%, v/v), namun perkembangan blastokista berkurang dengan suplementasi melatonin dalam kondisi oksigen rendah (5%, v/v;Papis dkk., 2007). Manfaat pada tekanan oksigen tinggi mungkin mencerminkan aktivitas melatonin dalam menangkal radikal bebas, namun gangguannya terhadap perkembangan embrio pada oksigen 5% masih belum jelas. Ada juga laporan yang menjelaskan bahwa melatonin meningkatkan jumlah sel blastokista (Tabel 1) dan menetas setelah dibekukan dan dicairkan (Wang dkk., 2014a, 2014b;Pang dkk., 2016;Marques dkk., 2021). Selain itu, hal ini meningkatkan produksi blastokista dengan adanya paraquat, pestisida yang berdampak buruk pada reproduksi (Pang dkk., 2016). Penelitian di masa depan diperlukan untuk menentukan apakah suplementasi melatonin juga bermanfaat bagi retensi kehamilan embrio IVP.

Retinoid

Retinoid adalah analog vitamin A yang memediasi berbagai peristiwa seluler dengan berikatan dengan kompleks reseptor nuklir heterodimer yang terdiri dari reseptor asam retinoat (**RAR**) dan reseptor asam retinoat X (**RXR**;Das dkk., 2014;Ghyselinck dan Duester, 2019). Beberapa bentuk dari masing-masing tipe reseptor diekspresikan dalam embrio praimplantasi sapi (Mohan dkk., 2001,2002;Mamo dkk., 2005).

Tiga manuskrip telah menguji efek agonis RA atau RAR/RXR pada embrio IVP sapi (Rodriguez dkk., 2006, 2007b;Gomez dkk., 2008). Suplementasi dengan asam retinoat all-trans meningkatkan pembentukan blastokista dan jumlah sel blastokista pada beberapa penelitian tetapi tidak pada penelitian lain (Rodriguez dkk., 2006, 2007b;Gomez dkk., 2008). Demikian pula, paparan agonis RXR (LG100268) meningkatkan pembentukan blastokista dalam satu penelitian tetapi tidak pada penelitian lain (Rodriguez dkk., 2007b; Gomez dkk., 2008). Agonis ini juga mengurangi jumlah sel blastokista dan meningkatkan kejadian apoptosis (Rodriguez dkk., 2007b;Gomez dkk., 2008). Oleh karena itu, masih belum jelas apakah retinoid dan agonis RXR bermanfaat atau merugikan bagi perkembangan embrio sapi.

Asam Lemak dan Fosfolipid

Asam lemak tak jenuh ganda (**PUFA**) berfungsi sebagai agen pemberi sinyal dengan mengikat dan mengaktifkan reseptor teraktivasi proliferasi peroksisom (**PPAR**) yang digabungkan dengan RXR (Ahmadian dkk., 2013). Transkrip untuk gamma PPAR (***PPARG***) dan delta (***PPARD***) telah terdeteksi pada embrio praimplantasi sapi (Mohan dkk., 2002;Jiang dkk., 2014) dan PUFA ada dalam cairan rahim sapi (Giller dkk., 2018). Dua PUFA telah diuji. PUFA omega-6, asam linoleat (**LA**), telah terbukti tidak mempengaruhi atau mengurangi pembentukan blastokista embrio IVP (Tominaga dkk., 2000;Pereira dkk., 2007; Al Darwich dkk., 2010;Absalon-Medina dkk., 2014;Batista dkk., 2014;Accorsi dkk., 2016). Anehnya, penelitian yang gagal mendeteksi efek buruk LA pada pembentukan blastokista juga menggunakan media yang mengandung serum, sedangkan penelitian yang mengamati pengurangan pembentukan blastokista menggunakan formulasi media bebas serum. Namun, LA secara konsisten meningkatkan tingkat kelangsungan hidup pembekuan-pencairan embrio sapi IVP dan/atau meningkatkan jumlah sel blastokista setelah pencairan terlepas dari apakah media mengandung atau kekurangan serum (Tominaga dkk., 2000;Pereira dkk., 2007;Al Darwich dkk., 2010; Absalon-Medina dkk., 2014;Batista dkk., 2014;Accorsi dkk., 2016).

Ada satu laporan yang menjelaskan bagaimana PUFA omega-3, asam docosahexaenoic (**DHA**), mempengaruhi perkembangan embrio sapi IVP (Al Darwich dkk., 2010). Tidak ada efek menguntungkan dari DHA yang tercatat pada perkembangan blastokista, namun suplementasi menurunkan kelangsungan hidup pembekuan-pencairan dari pembentukan awal blastokista (hari ke 7 pasca-IVF). Namun, DHA tidak berpengaruh pada kelangsungan hidup blastokista yang terlambat terbentuk (hari ke 8 pasca IVF;Al Darwich dkk., 2010).

Prostaglandin F2α (**PGF**)dan prostaglandin E2 (**PGE2**) telah dieksplorasi sebagai embriokin, namun belum ada manfaat yang diamati pada embrio IVP (Scenna dkk., 2004). Namun sebuah laporan menunjukkan bahwa produksi PGF embrio dapat berfungsi sebagai penanda kualitas embrio, dimana embrio berkualitas rendah menghasilkan lebih banyak PGF dibandingkan embrio sehat (Grycmacher dkk., 2019).

Penelitian juga gagal mendeteksi aktivitas terkait embriokin untuk asam lisofosfatidat (**LPA**). Fosfolipid ini dapat mempengaruhi proliferasi sel somatik dan kejadian seluler lainnya dengan memanfaatkan seperangkat reseptor berpasangan protein G yang disebut reseptor LPA (**LPAR**) (Lin dkk., 2010). Transkrip untuk beberapa LPAR telah terdeteksi pada embrio praimplantasi sapi (Jiang dkk., 2014;Torres dkk., 2014) dan LPA terdapat di rahim sapi (Woclawek-Potocka dkk., 2009). Namun, satu publikasi yang mempelajari efek suplementasi LPA pada perkembangan embrio sapi IVP gagal menunjukkan manfaat LPA pada pembentukan blastokista (Torres dkk., 2014) sementara yang lain menemukan suplementasi LPA mempercepat pembentukan blastokista IVP (Yu dkk., 2021).

Ringkasnya, diperlukan lebih banyak penelitian untuk mengeksplorasi potensi manfaat PUFA, prostaglandin, dan LPA terhadap kelangsungan hidup embrio pasca transfer pada sapi. Saat ini hanya ada sedikit bukti yang menunjukkan bahwa asam lemak dan turunan asam lemak ini dapat berfungsi sebagai embrio selain mengamati bahwa LA berfungsi sebagai agen krioprotektif pada embrio sapi IVP.

Hormon Tiroid

Hormon tiroid, triiodothyronine (**T**)dan tiroksin (**T**),telah terdeteksi pada homogenat uterus sapi dan embrio praimplantasi mengekspresikan reseptornya (Rho dkk., 2018).Ashkar dkk. (2010) menemukan bahwa campuran T dan T meningkatkan pembentukan blastokista. Belum ada penelitian yang meneliti jumlah sel atau retensi kehamilan setelah suplementasinya.

Asam Hyaluronic

Asam hialuronat (**HA**) adalah glikosaminoglikan yang merupakan bagian dari matriks ekstraseluler dan reseptornya,*CD44*, diekspresikan oleh embrio praimplantasi sapi (Furnus dkk., 2003). Masih belum jelas apakah HA bermanfaat bagi embrio IVP

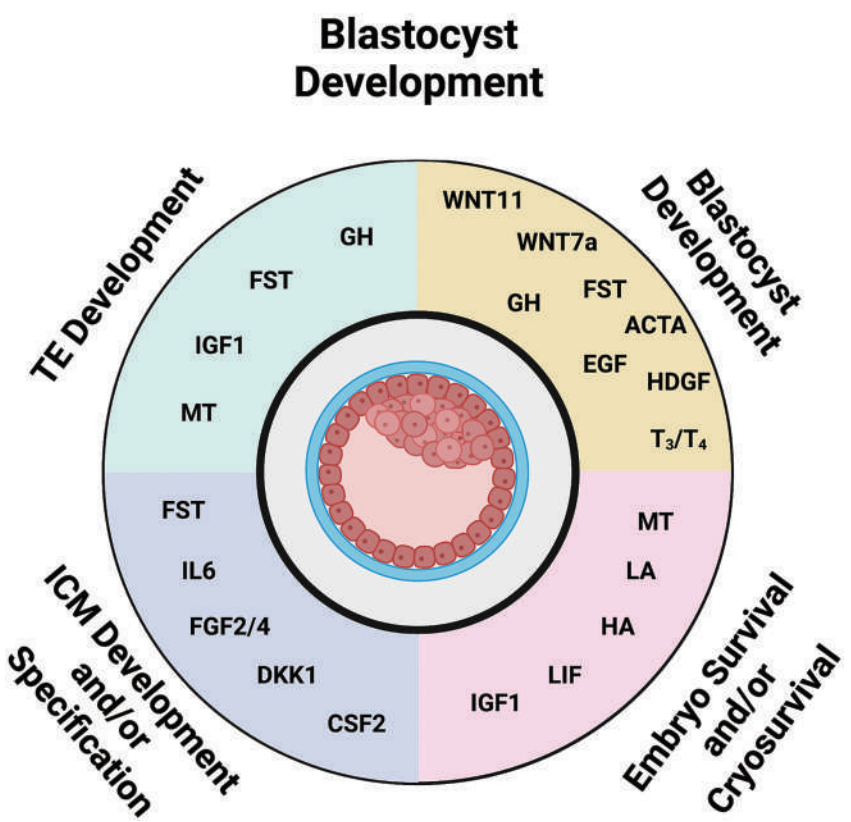
perkembangan. Satu laporan menemukan bahwa penambahan HA meningkatkan pembentukan blastokista IVP (Furnus dkk., 1998), namun penelitian lain gagal mendeteksi manfaat apa pun saat menggunakan konsentrasi HA yang sama (Saeed-Zidane dkk., 2019). Tidak ada efek terhadap jumlah sel blastokista yang terdeteksi pada kedua laporan, namun kedua penelitian menemukan bahwa HA dapat meningkatkan cryosurvival embrio IVP (Furnus dkk., 1998;Saeed-Zidane dkk., 2019).

Koktail Embriokin

Ada beberapa laporan yang menggambarkan manfaat tambahan dari penambahan dua atau lebih faktor bioaktif selama kultur embrio sapi in vitro (Tabel Tambahan S2). Idenya adalah bahwa embrio sapi terpapar pada banyak embrio dan faktor lain di saluran telur dan rahim, sehingga meningkatkan kompleksitas media kultur embrio dengan beberapa embrio akan lebih meniru lingkungan saluran telur dan rahim. Konsep ini sangat menarik ketika mempertimbangkan kemungkinan adanya tindakan sinergis untuk beberapa faktor. Bukti sinergi tersebut belum sepenuhnya dijelaskan, namun terdapat bukti adanya efek aditif pada campuran embriokin tertentu. Neira*dkk.* termasuk orang pertama yang mendeskripsikan efek aditif pada embriokin, dan mereka mengamati bahwa IGF1, IGF2, FGF2, TGFβ1, CSF2, dan LIF tidak mempengaruhi pembentukan blastokista sapi jika diberikan secara terpisah namun meningkatkan produksi blastokista jika ditambahkan bersama-sama (Neira dkk., 2010). Penelitian yang lebih baru oleh laboratorium ini menemukan bahwa penggabungan EGF, FGF2, dan IGF1 tidak menghasilkan efek tambahan apa pun pada pembentukan blastokista namun faktor-faktor ini mengandung kemampuan diferensial untuk mempengaruhi jumlah sel total dan TE dalam embrio (Xie dkk., 2017). Dalam penelitian tersebut, suplementasi IGF1 meningkat jumlah sel TE, sedangkan suplementasi EGF atau FGF2 tidak bisa; namun, pengobatan kombinasi EGF dan FGF2 meningkatkan jumlah sel TE. Beberapa contoh tambahan koktail embriokin tercantum dalamTabel Tambahan S2. Sebuah studi lanjutan mengeksplorasi efek campuran EGF, FGF2, dan IGF1 pada perkembangan embrio dan janin hingga hari ke 56 kehamilan (Vailes dkk., 2019). Tidak ada perbaikan dalam perkembangan embrio dan janin serta tingkat kehamilan yang diamati.

Kesimpulan dan Langkah ke Depan

Banyak faktor yang telah dipelajari mengenai kemampuannya mempengaruhi perkembangan embrio sapi dan/atau hasil kebuntingan pasca transfer pada sapi. Berdasarkan literatur yang diteliti, kami mengusulkan bahwa setidaknya 8 embrio akan meningkatkan IVP pembentukan blastokista sapi, 9 embrio mempengaruhi jumlah sel TE atau ICM, dan 5 embrio meningkatkan kelangsungan hidup embrio terhadap stresor, termasuk kriopreservasi (Gambar 2). Selain itu, 4 embriokin telah diidentifikasi untuk meningkatkan retensi kehamilan embrio IVP setelah ET (Tabel 1). Perbaikan dalam pembentukan blastokista IVP bermanfaat jika dilakukan secara komersial karena hal ini akan meningkatkan jumlah embrio IVP yang dapat ditransfer. Dalam beberapa kasus, tidak jelas apakah blastokista yang diberi embriokin ini memiliki kompetensi yang lebih besar untuk bertahan hidup setelah ET. Saat ini ada subset embrio yang dapat mempengaruhi ICM, TE, dan/atau jumlah sel total dengan cara yang dapat meningkatkan kualitas embrio dan kompetensi keseluruhan setelah ET. Korelasi antara jumlah TE dan retensi kehamilan belum diketahui, namun terdapat beberapa bukti yang menunjukkan bahwa peningkatan jumlah sel ICM dapat memperbaiki kehamilan pasca transfer.



Gambar 2. Ringkasan embrio dengan efek positif yang terdokumentasi terhadap perkembangan blastokista, kelangsungan hidup embrio, termasuk cryosurvival, pengembangan dan/atau spesifikasi ICM, dan pengembangan TE.

retensi (Iwasaki dkk., 1990;Ushijima dkk., 2008;Loureiro dkk., 2009;Denikol dkk., 2014).

Lebih sedikit informasi yang tersedia bagi sebagian besar embrio mengenai apakah suplementasi mereka akan mempunyai pengaruh positif terhadap hasil kehamilan setelah ET. Meskipun hal ini disayangkan, hal ini dapat dimengerti mengingat upaya dan biaya yang diperlukan untuk menyelesaikan studi ET skala besar pada sapi. Untungnya, beberapa suplemen tampaknya bermanfaat bagi kehamilan yang berasal dari embrio sapi IVP (Gambar 2). Empat embriokin tersebut dapat disebutkan di sini: CSF2, DKK1, IL6, dan IGF1. Manfaat IGF1 hanya terlihat pada bulan-bulan musim panas ketika penerima terkena suhu tinggi. Selain itu, IL6 baru diuji hingga usia kehamilan 70 hari, dimana suplementasinya menghasilkan kehamilan yang lebih mirip dengan kehamilan yang diperoleh secara in vivo melalui AI (Seekford dkk., 2021). Studi ET skala besar diperlukan untuk menjelaskan apakah potensi manfaat pada kehamilan ini akan menghasilkan anak sapi yang sehat.

Salah satu kesimpulan yang dapat diambil dari pengamatan ini adalah bahwa pengembangan, kualitas, dan kelangsungan hidup embrio sapi IVP pasca-transfer dapat ditingkatkan dengan menambah faktor bioaktif yang ditemukan di saluran telur, rahim, atau diproduksi oleh embrio itu sendiri. Diperlukan lebih banyak penelitian untuk memperjelas konsekuensi pasca-transfer dari penambahan embriokin yang diduga ini dan dalam mengeksplorasi kombinasi spesifik embrio yang paling baik dalam mensimulasikan lingkungan saluran telur dan rahim. Pada akhirnya, perbaikan dalam pemahaman kita tentang jaringan sinyal spesifik yang diperlukan untuk embriogenesis yang tepat dan kelangsungan hidup pasca-blastokista sangat penting untuk dilakukan sehingga kita dapat memastikan bahwa persentase yang lebih besar dari embrio yang dibuahi mencapai perkembangan dan persyaratan kualitas yang perlu dipertimbangkan untuk ET. . Penting juga bagi kita untuk lebih memahami bagaimana memprogram embrio IVP yang sedang berkembang untuk retensi kehamilan yang optimal dan produksi anak sapi yang sehat.

Ucapan Terima Kasih

Pendanaan untuk pekerjaan ini disediakan oleh Hibah Kompetitif Inisiatif Penelitian Pertanian dan Pangan nomor 2017-67015-2646 dan 2021-67015-34485 dari Institut Pangan dan Pertanian Nasional USDA dan oleh hibah Institut Kesehatan Nasional nomor R21-OD026516-01. Dukungan beasiswa untuk LKW diberikan oleh Program Beasiswa Doktor Institut Teknologi Kritis dan Sains Terapan (ICTAS) di Virginia Tech dan oleh Hibah Kompetitif Inisiatif Penelitian Pertanian dan Pangan nomor 2018-67011-27993 dari Institut Pangan dan Pertanian Nasional USDA. MLR dan ADE adalah peserta Proyek Multistate NE1727:*Pengaruh Ovarium, Rahim, dan Embrio Terhadap Keberhasilan Kebuntingan Pada Hewan Ruminansia*.

Konflik kepentingan

Para penulis tidak memiliki konflik kepentingan aktual atau potensial yang dapat mempengaruhi kemampuan mereka untuk menyajikan atau meninjau penelitian atau data secara objektif.

Daftar pustaka

Absalon-Medina, VA, SJ Bedford-Guaus, RO Gilbert, LC Siqueira, G. Esposito, A. Schneider, SH Cheong, dan WR Butler. 2014. Pengaruh isomer asam linoleat terkonjugasi cis-9,trans-11 dan trans-10,cis-12 pada produksi embrio sapi in vitro dan kriopreservasi.*J. Ilmu Susu*. 97:6164–6176. doi:10.3168/jds.2013-7719.

Accorsi, MF, BC Leao, NA Rocha-Frigoni, SH Perri, dan GZ Mingoti. 2016. Penurunan kandungan lipid sitoplasma pada embrio sapi yang dikultur in vitro dengan asam linoleat dalam medium semi-terdefinisi berkorelasi dengan peningkatan kriotoleransi.*Zigot*. 24:485– 494.doi:10.1017/S0967199415000428.

Ahmadian, M., JM Suh, N. Hah, C. Liddle, AR Atkins, M. Downes, dan RM Evans. 2013. Pensinyalan dan metabolisme PPARgamma: yang baik, yang buruk dan masa depan.*Nat. medis*. 19:557–566. doi:10.1038/nm.3159.

Ahumada, CJ, I. Salvador, A. Cebrian-Serrano, R. Lopera, dan M. A. Silvestre. 2013. Pengaruh suplementasi faktor pertumbuhan yang berbeda pada media kultur embrio dengan jumlah embrio sapi yang sedikit terhadap perkembangan dan kualitas embrio in vitro.*Satwa*. 7:455–462. doi:10.1017/S1751731112001991.

Al Darwich, A., C. Perreau, MH Petit, P. Papillier, J. Dupont, D. Guillaume, P. Mermillod, dan F. Guignot. 2010. Pengaruh PUFA terhadap krioresistensi embrio, ekspresi gen dan fosforilasi AMPKalpha pada embrio sapi turunan IVF.*Prostaglandin Mediat Lipid Lainnya*. 93:30–36. doi:10.1016/j.prostaglandin.2010.06.002.

Al Naib, A., S. Mamo, GM O'Gorman, P. Lonergan, A. Swales, dan T.Adil. 2011. Regulasi ekspresi mRNA kelas I kompleks histokompatibilitas utama non-klasik pada embrio sapi. *J.Reproduksi. imunol*. 91:31–40. doi:10.1016/j.jri.2011.05.005.

Ashkar, FA, E. Semple, CH Schmidt, E. St John, PM Bartlewski, dan WA Raja. 2010. Suplementasi hormon tiroid meningkatkan perkembangan embrio sapi secara in vitro.*Bersenandung. mereproduksi*. 25:334–344. doi:10.1093/humrep/dep394.

Ashry, M., K. Lee, JK Folger, SK Rajput, dan GW Smith. 2018a. Suplementasi follistatin selama kultur embrio in vitro meningkatkan kompetensi perkembangan embrio sapi yang dihasilkan menggunakan semen yang disortir berdasarkan jenis kelamin.*mereproduksi. biologi*. 18:267–273. doi:10.1016/j.repbio.2018.06.004.

Ashry, M., SK Rajput, JK Folger, JG Knott, NA Hemeida, OM Kandil, RS Ragab, dan GW Smith. 2018b. Peran fungsional pensinyalan AKT dalam perkembangan embrio awal sapi: hubungan potensial dengan tindakan embriotrofik follistatin.*mereproduksi. biologi. Endokrinol*. 16:1. doi:10.1186/s12958-017-0318-6.

Augustin, R., P. Pocar, C. Wrenzycki, H. Niemann, dan B. Fischer. 2003. Aktivitas mitogenik dan anti-apoptosis insulin pada embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*Reproduksi*. 126:91–99. doi:10.1530/rep.0.1260091.

Baker, J., MP Hardy, J. Zhou, C. Bondy, F. Lupu, AR Bellve, dan A. Efstratiadis. 1996. Pengaruh mutasi nol gen Igf1 pada reproduksi tikus.*mol. Endokrinol*. 10:903–918. doi:10.1210/perbaikan 10.7.8813730.

Baker, J., JP Liu, EJ Robertson, dan A. Efstratiadis. 1993. Peran dalam-faktor pertumbuhan seperti sulin dalam pertumbuhan embrio dan pascakelahiran.*Sel*. 75:73–82. doi:10.1016/S0092-8674(05)80085-6.

Banliat, C., F. Dubuisson, E. Corbin, J. Beurois, D. Tomas, D. Le Bourhis, P. Salvetti, V. Labas, P. Mermillod, dan M. Saint-Dizier. 2019. Konsentrasi hormon steroid intraoviduktal selama kultur in vitro mengubah profil fosfolipid dan kriotoleransi embrio sapi. *mol. mereproduksi. Dev*. 86:661–672. doi:10.1002/mrd.23144.

Bao, C., J. Wang, W. Ma, X. Wang, dan Y. Cheng. 2014.HDGF: a novel jack-of-all-trade dalam bidang kanker.*Onkol Masa Depan*. 10:2675–2685. doi:10.2217/fon.14.194.

Barrera, AD, EV Garcia, dan DC Miceli. 2018. Pengaruh eksog-enous mengubah faktor pertumbuhan beta1 (TGF-beta1) pada perkembangan awal embrio sapi.*Zigot*. 26:232–241. doi:10.1017/S096719941800014X.

Batista, RI, NR Raposo, PH Campos-Junior, MM Pereira, L. S. Camargo, BC Carvalho, MA Gama, dan JH Viana. 2014. Asam linoleat terkonjugasi Trans-10, cis-12 mengurangi kandungan lipid netral dan dapat mempengaruhi kriotoleransi pada persilangan yang diproduksi secara in vitro

embrio sapi.*J.Anim. Sains. Bioteknologi*. 5:33. doi:10.1186/2049-1891-5-33.

Becher, B., S. Tugues, dan M. Greter. 2016. GM-CSF: dari faktor pertumbuhan untuk menjadi mediator sentral peradangan jaringan.*Kekebalan*. 45:963– 973.doi:10.1016/j.imun.2016.10.026.

Bergan-Roller, HE, dan MA Sheridan. 2018. Hormon pertumbuhan sistem pensinyalan: wawasan tentang koordinasi tindakan anabolik dan katabolik hormon pertumbuhan.*Jenderal Komp. Endokrinol*. 258:119–133. doi:10.1016/j.ygcen.2017.07.028.

Biechele, S., K. Cockburn, F. Lanner, BJ Cox, dan J. Rossant. 2013. Pensinyalan Wnt yang bergantung pada Porcn tidak diperlukan sebelum gastrulasi tikus.*Perkembangan*. 140:2961–2971. doi:10.1242/dev.094458. Blok, J., M. Drost, RL Monson, JJ Rutledge, RM Rivera, FF Paula-Lopes, OM Ocon, CE Krininger, J. Liu, dan PJ Hansen. 2003. Penggunaan faktor pertumbuhan mirip insulin-I selama kultur embrio dan pengobatan penerima dengan hormon pelepas gonadotropin untuk meningkatkan angka kebuntingan setelah transfer embrio yang diproduksi secara in vitro ke sapi yang mengalami stres panas dan menyusui.*J.Anim. Sains*. 81:1590–1602. doi:10.2527/2003.8161590x

Block, J., AE Fischer-Brown, TM Rodina, AD Ealy, dan PJ Hansen. 2007. Pengaruh pengobatan in vitro embrio sapi dengan IGF-1 pada perkembangan selanjutnya di dalam rahim hingga hari ke 14 kehamilan.*Teriogenologi*. 68:153–161. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.045.

Blok, J., C. Wrenzycki, H. Niemann, D. Herrmann, dan PJ Hansen. 2008. Pengaruh faktor pertumbuhan seperti insulin-1 pada karakteristik seluler dan molekuler blastokista sapi yang diproduksi secara in vitro.*mol. mereproduksi. Dev*. 75:895–903. doi:10.1002/mrd.20826.

Bonilla, AQ, LJ Oliveira, M.Ozawa, EM Newsom, MC Lucy, dan PJ Hansen. 2011a. Perubahan perkembangan dalam tindakan termoprotektif faktor pertumbuhan mirip insulin-1 pada embrio sapi praimplantasi.*Endokrinol Sel Mol*. 332:170–179. doi:10.1016/j.mce.2010.10.009.

Bonilla, AQ, M.Ozawa, dan PJ Hansen. 2011b. Waktu dan ketergantungan pada sinyal protein kinase teraktivasi mitogen untuk tindakan pro-perkembangan faktor pertumbuhan mirip insulin 1 pada embrio sapi praimplantasi.*Horm Pertumbuhan IGF Res*. 21:107–111.doi:10.1016/j.ghir.2011.03.003.

Bonilla, L., J. Block, AC Denicol, dan PJ Hansen. 2014. Konsekuensi-es transfer embrio yang diproduksi secara in vitro untuk induk dan anak sapi yang dihasilkan.*J. Ilmu Susu*. 97:229–239. doi:10.3168/jds.2013-6943. Byrne, AT, J. Southgate, DR Brison, dan HJ Leese. 2002. Regulasi apoptosis pada blastokista sapi oleh insulin dan superfamili faktor pertumbuhan mirip insulin (IGF).*mol. mereproduksi. Dev*. 62:489–495. doi:10.1002/mrd.10153.

Chen, SC, TH Hu, CC Huang, ML Kung, TH Chu, LN Yi, ST Huang, HH Chan, JH Chuang, LF Liu, dkk. 2015. Faktor pertumbuhan turunan hepatoma/sumbu nukleolin sebagai jalur onkogenik baru dalam karsinogenesis hati.*target onco*. 6:16253–16270. doi:10.18632/oncotarget.3608.

Clemente, M., J. de La Fuente, T. Fair, A. Al Naib, A. Gutierrez-Adan, JF Roche, D. Rizos, dan P. Lonergan. 2009. Pemanjangan progesteron dan konseptus pada sapi: efek langsung pada embrio atau efek tidak langsung melalui endometrium?.*Reproduksi*. 138:507–517. doi:10.1530/REP-09-0152.

Cockburn, K., dan J. Rossant. 2010. Pembuatan blastokista: pelajaran dari tikus.*J.Klin. Menginvestasikan*. 120:995–1003. doi:10.1172/JCI41229.

Cooke, FN, KA Pennington, Q. Yang, dan AD Ealy. 2009. Beberapa faktor pertumbuhan fibroblas diekspresikan selama perkembangan konseptus sapi pra-keterikatan dan mengatur ekspresi interferon-tau dari trofektoderm.*Reproduksi*. 137:259–269. doi:10.1530/ REP-08-0396 .

Correia-Alvarez, E., E. Gomez, D. Martin, S. Carrocera, S. Perez, J. Otero, N. Peynot, C. Giraud-Delville, JN Caamano, O. Sandra, dkk. 2015. Ekspresi dan lokalisasi reseptor interleukin 1 beta dan interleukin 1 (tipe I) pada endometrium dan embrio sapi. *J.Reproduksi. imunol*. 110:1–13. doi:10.1016/j. jri.2015.03.006.

Das, BC, P. Thapa, R. Karki, S. Das, S. Mahapatra, TC Liu, I. Torregroza, DPWallace, S. Kambhampati, P. Van Veldhuizen, dkk. 2014. Jalur sinyal asam retinoat dalam perkembangan dan penyakit. *Bioorg. medis. kimia*. 22:673–683. doi:10.1016/j.bmc.2013.11.025.

de Moraes, AA, JA Davidson, JG Fleming, FW Bazer, JL Edwards, JG Betts, dan PJ Hansen. 1997. Kurangnya pengaruh faktor perangsang koloni granulosit-makrofag terhadap sekresi interferon-tau, protein lain, dan prostaglandin E2 oleh konseptus sapi dan bakal biji.*Anim Domestik. Endokrinol*. 14:193–197. doi:10.1016/s0739-7240(97)00002-7.

Denicol, AC, J. Block, DE Kelley, KG Pohler, KB Dobbs, C. J. Mortensen, MS Ortega, dan PJ Hansen. 2014. Antagonis sinyal WNT Dickkopf-1 mengarahkan komitmen garis keturunan dan mendorong kelangsungan hidup embrio praimplantasi.*FASEB J*. 28:3975–3986. doi:10.1096/fj.14-253112.

Denicol, AC, KB Dobbs, KM McLean, SF Carambula, B. Loureiro, dan PJ Hansen. 2013. Pensinyalan WNT kanonik mengatur perkembangan embrio sapi ke tahap blastokista.*Sains. Reputasi*. 3:1266. doi:10.1038/srep01266.

Dhali, A., VM Anchamparuthy, SP Butler, RE Pearson, dan FC Gwazdauska. 2009. Pengembangan embrio sapi secara in vitro yang dikultur dengan faktor sel induk atau insulin-like growth factor-I setelah program bayi tabung dengan air mani dua ekor sapi jantan yang mempunyai fertilitas lapangan berbeda.*animasi. mereproduksi. Sains*. 116:188–195. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.02.007. Dinarello, CA 2018. Gambaran umum keluarga IL-1 pada bawaan peradangan dan kekebalan yang didapat.*imunol. Putaran*. 281:8–27. doi:10.1111/imr.12621.

Dobbs, KB, FA Khan, M. Sakatani, JI Moss, M. Ozawa, AD Ealy, dan PJ Hansen. 2013a. Pengaturan pluripotensi massa sel bagian dalam dan pertumbuhan serta diferensiasi trofektoderm embrio sapi dengan faktor perangsang koloni 2.*biologi. mereproduksi*. 89:141. doi:10.1095/biolreprod.113.113183.

Dobbs, KB, M. Rodriguez, MJ Sudano, MS Ortega, dan PJ Hansen. 2013b. Dinamika metilasi DNA selama perkembangan awal embrio sapi praimplantasi.*PLoS Satu*8:e66230. doi:10.1371/jurnal.pone.0066230.

Dougan, M., G.Dranoff, dan SK Dougan. 2019. GM-CSF, IL-3, Dan Keluarga sitokin IL-5: pengatur peradangan.*Kekebalan*. 50:796–811. doi:10.1016/j.imun.2019.03.022.

Dreux, AC, DJ Lamb, H. Modjtahedi, dan GA Ferns. 2006. Itu reseptor faktor pertumbuhan epidermal dan keluarga ligannya: peran yang diduga dalam aterogenesis.*Aterosklerosis*. 186:38–53. doi:10.1016/j.aterosklerosis.2005.06.038.

Ealy, AD, LK Wooldridge, dan SR McCoski. 2019. Dewan diundang ulasan: konsekuensi pasca transfer embrio yang diproduksi secara in vitro pada sapi.*J.Anim. Sains*. 97:2555–2568. doi:10.1093/jas/skz116.

Eckert, J., dan H. Niemann. 1998. ekspresi mRNA dari leukemia faktor penghambat mia (LIF) dan subunit reseptornya glikoprotein 130 dan reseptor LIF-beta pada embrio sapi yang diturunkan secara in vitro atau in vivo.*mol. Bersenandung. mereproduksi*. 4:957–965. doi:10.1093/molehr/4.10.957.

Eulenfeld, R.,A. Dittrich, C. Khouri, PJMuller, B.Mutze, A.Wolf, dan F. Pemburu. 2012. Pensinyalan Interleukin-6: lebih dari Jaks dan STAT. *euro. J. Biol Sel*. 91:486–495. doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.010.

Farin, PW, dan CE Farin. 1995. Transfer embrio sapi diinduksi in vivo atau in vitro: kelangsungan hidup dan perkembangan janin. *biologi. mereproduksi*. 52:676–682. doi:10.1095/biolreprod52.3.676.

Farin, PW, JA Piedrahita, dan CE Farin. 2006. Kesalahan dalam pengembangan pengambilan janin dan plasenta dari embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*Teriogenologi*. 65:178–191. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.022.

Fields, SD, PJ Hansen, dan AD Ealy. 2011. Pertumbuhan fibroblas persyaratan faktor untuk pengembangan in vitro embrio sapi. *Teriogenologi*. 75:1466–1475. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.12.007

Banjir, MR, TL Gage, dan TD Bunch. 1993. Pengaruh yang bermacam-macam faktor pemacu pertumbuhan pada perkembangan embrio sapi praimplantasi in vitro.*Teriogenologi*. 39:823–833. doi:10.1016/0093-691X(93)90421-Z

Fukui, Y., dan K. Matsuyama. 1994. Pengembangan mesin in vitro embrio sapi yang dibuahi dan dibuahi dikultur dalam media yang mengandung faktor penghambat leukemia manusia.*Teriogenologi*. 42:663–673. doi:10.1016/0093-691x(94)90383-t.

Furnus, CC, DG de Matos, dan AG Martinez. 1998. Pengaruh asam hialuronat pada pengembangan embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*Teriogenologi*. 49:1489–1499. doi:10.1016/s0093-691x(98)00095-8.

Furnus, CC, A. Valcarcel, FN Dulout, dan AL Errecalde. 2003. Itu reseptor asam hialuronat (CD44) diekspresikan dalam oosit sapi dan embrio tahap awal.*Teriogenologi*. 60:1633–1644. doi:10.1016/s0093-691x(03)00116-x.

Gandolfi, F., S. Modina, TA Brevini, L. Passoni, P. Artini, F. Petraglia, dan A. Lauria. 1995. Activin beta Sebuah subunit dinyatakan dalam saluran telur sapi.*mol. mereproduksi. Dev.* 40:286–291. doi:10.1002/mrd.1080400304.

Garcia, EV, DC Miceli, G. Rizo, PA Valdecantos, dan AD Barrera. 2015. Pengaruh penambahan awal protein morfogenetik tulang 5 (BMP5) ke media kultur embrio terhadap perkembangan in vitro dan ekspresi gen penting perkembangan pada embrio praimplantasi sapi.*Teriogenologi*. 84:589–599. doi:10.1016/j.theriogenologi.2015.04.018.

Garcia, EV, PA Valdecantos, D. Barrera, M. Roldan-Olarte, dan D. C.Miceli. 2014. Protein morfogenetik tulang di saluran telur sapi: ekspresi diferensial BMP-5 di tanah genting selama siklus estrus. *Teriogenologi*. 81:1032–1041. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.025.

Geisert, RD, CY Lee, FA Simmen, MT Zavy, AE Fliss, FW Bazer, dan RC Simmen. 1991. Ekspresi RNA pembawa pesan yang mengkode faktor pertumbuhan mirip insulin-I, -II, dan faktor pertumbuhan mirip insulin yang mengikat protein-2 di endometrium sapi selama siklus estrus dan awal kehamilan.*biologi. mereproduksi*. 45:975–983. doi:10.1095/biolreprod45.6.975.

Ghyselinck, NB, dan G. Duester. 2019. Jalur pensinyalan asam retinoat-cara.*Perkembangan*146. doi:10.1242/pengembangan.167502.

Giller, K., B. Drews, J. Berard, H. Kienberger, M. Schmicke, J. Frank, B. Spanier, H. Daniel, G. Geisslinger, dan SE Ulbrich. 2018. Pemanjangan embrio sapi diubah karena suplementasi asam lemak ibu.*biologi. mereproduksi*. 99:600–610. doi:10.1093/biolre/ioy084.

Gomez, E., Carrocera, S., D. Martin, MJ Sanchez-Calabuig, A. Gutierrez-Adan, A. Murillo, dan M. Munoz. 2017. Faktor pertumbuhan turunan hepatoma: kuantifikasi protein dalam cairan rahim, ekspresi gen dalam kultur sel endometrium dan efeknya pada perkembangan embrio in vitro, kehamilan dan kelahiran.*Teriogenologi*. 96:118–125. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.04.008

Gomez, E., E. Correia-Alvarez, JN Caamano, C. Diez, S. Carrocera, N. Peynot, D. Martin, C. Giraud-Delville, V. Duranthon, O. Sandra, dkk. 2014. Faktor pertumbuhan turunan hepatoma: dari rahim sapi hingga kultur embrio in vitro.*Reproduksi*. 148:353–365. doi:10.1530/REP-14-0304.

Gomez, E., A. Rodriguez, M. Munoz, JN Caamano, S. Carrocera, D. Martin, N. Facal, dan C. Diez. 2008. Pengembangan dan kualitas morula sapi yang dikultur dalam media bebas serum dengan agonis reseptor retinoid spesifik.*mereproduksi. Subur. Dev.* 20:884–891. doi:10.1071/rd08103.

Grycmacher, K., D. Boruszewska, E. Sinderewicz, I. Kowalczyk-Zieba, J. Staszkiewicz-Chodor, dan I. Woclawek-Potocka. 2019. Kemungkinan produksi Prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) dan ekspresi reseptornya pada embrio sapi praimplantasi yang dibelah awal dan akhir.*Dokter Hewan BMC. Res*. 15:203. doi:10.1186/s12917-019-1939-0. Hansen, PJ 2020. Janji trans-embrio yang belum terpenuhi sepenuhnya fer pada sapi-mengapa angka kebuntingan tidak lebih besar dan apa yang dapat kita lakukan untuk mengatasinya?*J.Anim. Sains*. 98. doi:10.1093/jas/skaa288.

Herrler, A., A. Lucas-Hahn, dan H. Niemann. 1992. Pengaruh asuransi faktor pertumbuhan seperti lin-I pada produksi embrio sapi secara in-vitro. *Teriogenologi*. 37:1213–1224.

Hickman, CF, A. Ainslie, AD Ealy, CJ Ashworth, dan JA Rooke. 2011. Pengaruh stimulasi koloni granulosit-makrofag ovine faktor pada perkembangan embrio in vitro sapi dan sekresi interferon-tau blastokista.*mereproduksi. Domestik. animasi*. 46:608–615. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01710.x.

Huelsken, J., R. Vogel, V. Brinkmann, B. Erdmann, C. Birchmeier, dan W. Birchmeier. 2000. Kebutuhan beta-catenin dalam pembentukan sumbu anterior-posterior pada mencit.*J. Biol Sel*. 148:567–578. doi:10.1083/jcb.148.3.567.

Ibrahim, LA, JA Rizo, PLP Fontes, GC Lamb, dan JJ Brombidang. 2019. Plasma seminalis memodulasi ekspresi meditator inflamasi endometrium pada bovinedagger.*biologi. mereproduksi*. 100:660–671. doi:10.1093/biolre/ioy226.

Iwasaki, S., N. Yoshiba, H. Ushijima, S. Watanabe, dan T. Nakahara. 1990. Morfologi dan proporsi massa sel bagian dalam blastokista sapi yang dibuahi secara in vitro dan in vivo.*J.Reproduksi. Subur*. 90:279–284.doi:10.1530/jrf.0.0900279.

Iwata, H., M. Ohota, S. Hashimoto, K. Kimura, M. Isaji, dan M.Miyake. 2003. Efek spesifik tahapan hormon pertumbuhan terhadap kompetensi perkembangan embrio sapi yang diproduksi secara in-vitro. *J.Reproduksi. Dev.* 49:493–499. doi:10.1262/jrd.49.493.

Izadyar, F., HT Van Tol, WG Hage, dan MM Bevers. 2000. Praimplantasi embrio sapi mengekspresikan mRNA reseptor hormon pertumbuhan dan merespons penambahan hormon pertumbuhan selama pengembangan in vitro.*mol. mereproduksi. Dev.* 57:247–255. doi:10.1002/1098- 2795(200011)57:3<247::AID-MRD6>3.0.CO;2-Q.

Jackson, LR, CE Farin, dan S. Whisnant. 2012. Nekrosis tumor faktor alfa menghambat perkembangan embrio sapi in vitro melalui mekanisme yang dimediasi prostaglandin.*J.Anim. Sains. Bioteknologi*. 3:7. doi:10.1186/2049-1891-3-7.

Jiang, Z., J. Sun, H. Dong, O. Luo, X. Zheng, C. Obergfell, Y. Tang, J. Bi, R. O'Neill, Y.Ruan, dkk. 2014. Profil transkripsi pengembangan pra-implantasi sapi in vivo.*Genomik BMC*15:756. doi:10.1186/1471-2164-15-756.

Jousan, FD, dan PJ Hansen. 2004. Faktor pertumbuhan seperti insulin-I sebagai faktor kelangsungan hidup embrio praimplantasi sapi yang terkena sengatan panas.*biologi. mereproduksi*. 71:1665–1670. doi:10.1095/biolreprod.104.032102

Jousan, FD, dan PJ Hansen. 2007. Faktor pertumbuhan seperti insulin-I promenunjukkan resistensi embrio praimplantasi sapi terhadap sengatan panas melalui tindakan independen dari tindakan anti-apoptosis yang memerlukan pensinyalan PI3K.*mol. mereproduksi. Dev.* 74:189–196. doi:10.1002/ mrd.20527.

Jousan, FD, LJ Oliveira, dan PJ Hansen. 2008. Budaya jangka pendek Teknologi embrio praimplantasi sapi yang diproduksi secara in vitro dengan faktor pertumbuhan seperti insulin-I mencegah apoptosis yang disebabkan oleh sengatan panas melalui aktivasi jalur fosfatidilinositol 3-kinase/Akt.*mol. mereproduksi. Dev.* 75:681–688. doi:10.1002/mrd.20830.

Kannampuzha-Francis, J., AC Denicol, B. Loureiro, K. Kaniyamattam, MS Ortega, dan PJ Hansen. 2015. Paparan faktor perangsang koloni 2 selama perkembangan praimplantasi meningkatkan pertumbuhan sapi pascakelahiran.*mol. mereproduksi. Dev.* 82:892–897. doi:10.1002/mrd.22533.

Kannampuzha-Francis, J., P. Tribulo, dan PJ Hansen. 2017. Tindakan aktivin A, faktor pertumbuhan jaringan ikat, faktor pertumbuhan hepatosit dan faktor pertumbuhan turunan teratokarsinoma 1 pada perkembangan embrio praimplantasi sapi.*mereproduksi. Subur. Dev.* 29:1329–1339. doi:10.1071/RD16033.

Keefer, CL, SL Stice, AM Paprocki, dan P. Golueke. 1994. Dalam vitro kultur embrio sapi IVM-IVF: interaksi kooperatif antar embrio dan peran faktor pertumbuhan.*Teriogenologi*. 41:1323–1331. doi:10.1016/0093-691x(94)90491-z.

Khan, DR, E. Fournier, I. Dufort, FJ Richard, J. Singh, dan MA Tuan. 2016. Meta-analisis profil ekspresi gen pada sel granulosa selama folikulogenesis.*Reproduksi*. 151:R103–R110. doi:10.1530/REP-15-0594.

Khurana, NK, dan H. Niemann. 2000. Metabolisme energi pada masa praembrio sapi perkebunan yang diperoleh secara in vitro atau in vivo.*biologi. mereproduksi*. 62:847–856. doi:10.1095/biolreprod62.4.847.

Killeen, AP, DG Morris, DA Kenny, MP Mullen, MG Diskin, dan SM Perairan. 2014. Ekspresi gen global pada endometrium

sapi dara dengan kesuburan tinggi dan rendah selama fase pertengahan luteal dari siklus estrus.*Genomik BMC*15:234. doi: 10.1186/1471-2164-15-234.

Kocyigit, A., dan M. Cevik. 2015. Pengaruh faktor penghambat leukemia dan faktor pertumbuhan seperti insulin-I pada alokasi sel dan kriotoleransi blastokista sapi.*Kriobiologi*. 71:64–69. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.05.068.

Kocyigit, A., dan M. Cevik. 2017. Faktor penghambat leukemia; berinvestasi-menyelidiki efek tergantung waktu terhadap kelangsungan hidup embrio sapi yang mengalami vitrifikasi.*mereproduksi. Domestik. animasi*. 52:1113–1119. doi:10.1111/rda.13040.

Kolle, S., F. Sinowatz, G. Boie, D. Lincoln, G. Palma, M. Stojkovic, dan E.Serigala. 1998. Topografi ekspresi reseptor hormon pertumbuhan pada embrio sapi.*Histokimia. Biol Sel*. 109:417–419. doi:10.1007/s004180050243.

Kolle, S., M. Stojkovic, G. Boie, E. Wolf, dan F. Sinowatz. 2002. Pertumbuhan hormon menghambat apoptosis pada embrio sapi yang diproduksi secara in vitro. *mol. mereproduksi. Dev.* 61:180–186. doi:10.1002/mrd.1145. Kuijk, EW, LT van Tol, H. Van de Velde, R. Wubbolts, M. Welling, N. Geijsen, dan BA Roelen. 2012. Peran sinyal FGF dan MAP kinase dalam pemisahan garis keturunan sel epiblas dan hipoblas pada embrio sapi dan manusia.*Perkembangan*. 139:871– 882.doi:10.1242/dev.071688.

La Rosa, I., LS Camargo, MM Pereira, R. Fernandez-Martin, D. A. Paz, dan DF Salamone. 2011. Pengaruh protein morfogenik tulang 4 (BMP4) dan penghambatnya, Noggin, terhadap pematangan in vitro dan kultur embrio praimplantasi sapi.*mereproduksi. biologi. Endokrinol*. 9:18. doi:10.1186/1477-7827-9-18

Lamy, J., P. Liere, A. Piano, F. Aprahamian, P. Mermillod, dan M. Saint-Dizier. 2016. Hormon steroid pada cairan saluran telur sapi pada saat siklus estrus.*Teriogenologi*. 86:1409–1420. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.086.

Larson, JE, RL Krisher, dan GC Lamb. 2011. Pengaruh suplemen-mental progesteron terhadap perkembangan, metabolisme dan jumlah sel blastokista embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*mereproduksi. Subur. Dev.* 23:311–318. doi:10.1071/RD10106.

Larson, RC, GG Ignotz, dan WB Currie. 1992a. Berasal dari trombosit faktor pertumbuhan (PDGF) merangsang perkembangan embrio sapi selama siklus sel keempat.*Perkembangan*. 115:821–826. doi: 10.1242/dev.115.3.821.

Larson, RC, GG Ignotz, dan WB Currie. 1992b. Transformasi faktor pertumbuhan beta dan faktor pertumbuhan fibroblas dasar secara sinergis mendorong perkembangan embrio sapi awal selama siklus sel keempat.*mol. mereproduksi. Dev.* 33:432–435. doi:10.1002/mrd.1080330409.

Lee, ES, dan Y. Fukui. 1995. Pengaruh berbagai faktor pertumbuhan pada a media kultur tertentu pada pengembangan in vitro embrio sapi yang dimatangkan dan dibuahi secara in vitro.*Teriogenologi*. 44:71–83. doi: 10.1016/0093-691X(95)00149-3.

Lee, KB, A. Bettegowda, G. Wee, JJ Irlandia, dan GW Smith. 2009. Penentu molekuler kompetensi oosit: peran fungsional potensial follistatin ibu (berasal dari oosit) dalam mendorong embriogenesis awal sapi.*Endokrinologi*. 150:2463–2471. doi: 10.1210/en.2008-1574.

Lee, KB, JK Folger, SK Rajput, dan GW Smith. 2014. Tempo-regulasi ral mRNA untuk protein morfogenetik tulang (BMP) tertentu, reseptor BMP dan protein SMAD terkait selama perkembangan embrio awal sapi: efek BMP2 eksogen pada perkembangan perkembangan embrio.*mereproduksi. biologi. Endokrinol*. 12:67. doi:10.1186/1477-7827-12-67.

Li, C., Y. Ma, K. Yi, C. Wang, W. Li, Z. Liu, L. Sun, S. Chen, J. Yu, H. Li, dkk. 2014. Interaksi antara faktor pertumbuhan saraf dan gonadotropin pada saluran telur sapi.*animasi. mereproduksi. Sains*. 149:117–123. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.06.030.

Lim, KT, MK Gupta, SH Lee, YH Jung, DW Han, dan H. T.Lee. 2013. Kemungkinan keterlibatan jalur pensinyalan wnt/beta-catenin dalam penetasan dan diferensiasi trofektoderm blastokista babi.*Teriogenologi*. 79:284–290. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.08.018

Lim, KT, G. Jang, KH Ko, WW Lee, HJ Park, JJ Kim, SH Lee, WS Hwang, BC Lee, dan SK Kang. 2007. Peningkatan perkembangan embrio sapi in vitro dan peningkatan efisiensi dalam menghasilkan anak sapi yang layak menggunakan media tertentu.*Teriogenologi*. 67:293–302. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.011.

Lin, SAYA, DR Herr, dan J. Chun. 2010. Asam lisofosfatidat (LPA) reseptor: sifat sinyal dan relevansi penyakit.*Prostaglandin Mediat Lipid Lainnya*. 91:130–138. doi:10.1016/j.prostaglandin.2009.02.002.

Liu, JP, J.Baker, AS Perkins, EJ Robertson, dan A. Efstratiadis. 1993. Tikus membawa mutasi nol pada gen yang mengkode faktor pertumbuhan mirip insulin I (Igf-1) dan reseptor IGF tipe 1 (Igf1r).*Sel*. 75:59–72.

Liu, Z., RH Foote, dan X. Yang. 1995. Perkembangan sapi purba embrio dalam kultur bersama dengan KSOM dan taurin, superoksida dismutase atau insulin.*Teriogenologi*. 44:741–750. doi:10.1016/0093-691x(95)00253-5.

Lorda-Diez, CI, C. Duarte-Olivenza, JM Hurle, dan JA Mon-tero. 2022. Mengubah sinyal beta faktor pertumbuhan: ahli pematung jari.*Dev. Dyn*. 251(1):125–136. doi:10.1002/dvdy.349.

Lott, WM, VM Anchamparuthy, ML McGilliard, IK Mullarky, dan FC Gwazdauskas. 2011. Pengaruh sistein bersama dengan faktor pertumbuhan terhadap perkembangan embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*mereproduksi. Domestik. animasi*. 46:585–594. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01706.x.

Loureiro, B., J. Block, MG Favoreto, S. Carambula, KA Penning-ton, AD Ealy, dan PJ Hansen. 2011. Konsekuensi paparan konseptus terhadap faktor perangsang koloni 2 terhadap kelangsungan hidup, pemanjangan, sekresi interferon-{tau}, dan ekspresi gen.*Reproduksi*. 141:617–624. doi:10.1530/REP-10-0511. REP-10-0511 Loureiro, B., L. Bonilla, J. Block, JM Fear, AQ Bonilla, dan PJ Hansen. 2009. Faktor perangsang koloni 2 (CSF-2) meningkatkan perkembangan dan kelangsungan hidup embrio sapi pasca transfer yang diproduksi secara in vitro.*Endokrinologi*. 150:5046–5054. doi:10.1210/en.2009-0481. id.2009-0481

Luo, H., K. Kimura, M. Aoki, dan M. Hirako. 2002. Endo-vaskular faktor pertumbuhan thelial (VEGF) mendorong perkembangan awal embrio sapi dengan adanya sel kumulus.*J.Dokter Hewan. medis. Sains* . 64:967–971. doi:10.1292/jvms.64.967.

Lupicka, M., G. Bodek, N. Shpigel, E. Elnekave, dan AJ Korzekwa. 2015. Identifikasi sel berpotensi majemuk pada rahim sapi: studi in situ dan in vitro.*Reproduksi*. 149:317–327. doi:10.1530/REP-14-0348.

Makarevich, AV, dan M. Markkula. 2002. Apoptosis dan pro- sel potensi kehidupan embrio sapi yang distimulasi dengan faktor pertumbuhan mirip insulin I selama pematangan dan kultur in vitro.*biologi. mereproduksi*. 66:386–392. doi:10.1095/biolreprod66.2.386.

Mamo, S., S. Ponsuksili, K. Wimmers, M. Gilles, dan K. Schelland-eh. 2005. Ekspresi transkrip reseptor retinoid X dan signifikansinya terhadap kompetensi perkembangan embrio sapi tahap pra-implantasi yang diproduksi secara in vitro.*mereproduksi. Domestik. animasi*. 40:177–183. doi:10.1111/j.1439-0531.2005.00579.x. Marques, TC, EC da Silva, TO Diesel, LO Leme, CF Martins, M. Dode, BG Alves, F. Costa, EB de Oliveira, dan ML Gambarini. 2018. Melatonin mengurangi sel apoptosis, SOD2 dan HSPB1 serta meningkatkan produksi in vitro dan kualitas blastokista sapi.*mereproduksi. Domestik. animasi*. 53:226–236. doi:10.1111/rda.13097 Marques, TC, E. Santos, TO Diesel, CF Martins, HCB Cumpa, LO Leme, MAN Dode, BG Alves, FPH Costa, EB Oliveira, dkk. 2021. Penghapusan cairan blastocoel dan suplementasi melatonin dalam media kultur meningkatkan kelangsungan hidup embrio sapi yang mengalami vitrifikasi.*Teriogenologi*. 160:134–141. doi:10.1016/j.theriogenologi.2020.10.028.

Martins, T., G. Pugliesi, M. Sponchiado, AM Gonella-Diaza, OA Ojeda-Rojas, FD Rodriguez, RS Ramos, AC Basso, dan M. Binelli. 2018. Gangguan komposisi cairan luminal uterus merugikan pembentukan kebuntingan pada sapi.*J.Anim. Sains. Bioteknologi*. 9:70. doi:10.1186/s40104-018-0285-6.

Massague, J. 2012. Pensinyalan TGFbeta dalam konteks.*Nat. Pendeta Mol. Sel biologi*. 13:616–630. doi:10.1038/nrm3434.

Mathews, LS, RE Hammer, RR Behringer, AJ D'Ercole, GI Bell, RL Brinster, dan RD Palmiter. 1988. Peningkatan pertumbuhan tikus transgenik yang mengekspresikan faktor pertumbuhan mirip insulin manusia I. *Endokrinologi*. 123:2827–2833. doi:10.1210/endo-123-6-2827.

Matsui, M., Y. Takahashi, M. Hishinuma, dan H. Kanagawa. 1995. Insulin dan insulin-like growth factor-I (IGF-I) merangsang perkembangan embrio sapi yang dibuahi secara in vitro.*J.Dokter Hewan. medis. Sains*. 57:1109–1111. doi:10.1292/jvms.57.1109.

Mesalam, A., KL Lee, I. Khan, MMR Chowdhury, S. Zhang, SH Song, MD Joo, JH Lee, JI Jin, dan IK Kong. 2019. Kombinasi albumin serum sapi dengan insulin-transferrin-natrium selenit dan/atau faktor pertumbuhan epidermal sebagai alternatif serum janin sapi dalam media kultur meningkatkan kualitas embrio sapi dan invasi trofoblas melalui induksi matriks metaloproteinase. *mereproduksi. Subur. Dev*. 31:333–346. doi:10.1071/RD18162. Michael, DD, IM Alvarez, OM Ocon, AM Powell, NC Talbot, SE Johnson, dan AD Ealy. 2006. Faktor pertumbuhan fibroblas-2 diekspresikan oleh rahim sapi dan merangsang produksi interferon-tau pada trofektoderm sapi.*Endokrinologi*147:3571–3579. doi:10.1210/en.2006-0234. id.2006-0234

Mihalik, J., P. Rehak, dan J. Koppel. 2000. Pengaruh insulin terhadap pengembangan in vitro embrio tikus dan sapi.*Fisiol. Res*. 49:347–354.https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11043922/. Mohan, M., JR Malayer, RD Geisert, dan GL Morgan. 2001. Ekspresi RNA pembawa pesan protein pengikat retinol dan reseptor asam retinoat pada embrio sapi sebelum melekat.*mol. mereproduksi. Dev*. 60:289–296. doi:10.1002/mrd.1090.

Mohan, M., JR Malayer, RD Geisert, dan GL Morgan. 2002. Pola ekspresi reseptor retinoid X, retinaldehida dehidrogenase, dan gamma reseptor teraktivasi proliferator peroksisom pada embrio pra-pelekatan sapi.*biologi. mereproduksi*. 66:692–700. doi:10.1095/biolreprod66.3.692.

Moreira, F., FF Paula-Lopes, PJ Hansen, L. Badinga, dan WW Itu. 2002. Pengaruh hormon pertumbuhan dan faktor pertumbuhan mirip insulin-I terhadap perkembangan embrio sapi turunan in vitro. *Teriogenologi*. 57:895–907. doi:10.1016/s0093-691x(01)00694-x. Moss, JI, E. Pontes, dan PJ Hansen. 2009. Faktor pertumbuhan seperti insulin tor-1 melindungi embrio praimplantasi dari tindakan anti-perkembangan menadione.*Lengkungan. beracun*. 83:1001–1007. doi:10.1007/s00204-009-0458-3.

Munoz, M., FJ Corrales, JN Caamano, C. Diez, B. Trigal, MI Mora, D. Martin, S. Carrocera, dan E. Gomez. 2012. Proteome dialog awal embrio-ibu dalam rahim sapi.*J. Proteom Res*. 11:751–766. doi:10.1021/pr200969a.

Namwanje, M., dan CW Brown. 2016. Aktivin dan inhibin: peran dalam perkembangan, fisiologi, dan penyakit.*Pelabuhan Musim Semi Dingin. Perspektif. biologi*. 8. lakukan:10.1101/cshperspect.a021881.

Neira, JA, D. Tanturier, MA Pena, dan J. Martal. 2010. Efek hubungan IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, dan LIF terhadap perkembangan embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*Teriogenologi*. 73:595–604. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.10.015.

Nicola, NA, dan JJ Babon. 2015. Faktor penghambat leukemia (LIF). *Faktor Pertumbuhan Sitokin Rev*. 26:533–544. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.001.

Niehrs, C. 2012. Dunia pensinyalan reseptor WNT yang kompleks.*Nat. Pendeta Mol. Biol Sel*. 13:767–779. doi:10.1038/nrm3470. Ornitz, DM, dan N. Itoh. 2015. Faktor pertumbuhan fibroblas secara signifikan jalur naling.*Interdisipliner Wiley. Pdt. Dev. biologi*. 4:215–266. doi:10.1002/wdev.176.

Ozawa, M., QE Yang, dan AD Ealy. 2013. Ekspresi dari reseptor faktor pertumbuhan fibroblas selama pengembangan konseptus sapi awal dan analisis farmakologis dari tindakan mereka terhadap pertumbuhan trofoblas in vitro.*Reproduksi*. 145:191–201. doi:10.1530/REP-12-0220.

Palma, GA, M.Muller, dan G.Brem. 1997. Pengaruh mirip insulin faktor pertumbuhan I (IGF-I) pada konsentrasi tinggi pada blastokista pengembangan embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*J Reproduksi. Subur*. 110:347–353. doi:10.1530/jrf.0.1100347.

Pang, YW, YQ Sun, WJ Sun, WH Du, HS Hao, SJ Zhao, dan HB Zhu. 2016. Melatonin menghambat kematian sel yang disebabkan oleh paraquat pada embrio praimplantasi sapi.*J. Pineal Res*. 60:155–166. doi:10.1111/jpi.12297.

Papis, K., O. Poleszczuk, E. Wenta-Muchalska, dan JA Modlinski. 2007. Efek melatonin pada perkembangan embrio sapi in vitro sehubungan dengan konsentrasi oksigen.*J. Pineal Res*. 43:321–326. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00479.x.

Park, JE, HJ Oh, SG Hong, G. Jang, MK Kim, dan BC Lee. 2010. Pengaruh aktivin A pada pengembangan in vitro dan ekspresi mRNA embrio sapi yang dikultur dalam media kultur dua langkah yang ditentukan secara kimia.*mereproduksi. Domestik. animasi*. 45:585–593. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01306.x.

Paula-Lopes, FF, AA de Moraes, JL Edwards, JE Justice, dan PJ Hansen. 1998. Regulasi perkembangan praimplantasi embrio sapi dengan interleukin-1beta.*biologi. mereproduksi*. 59:1406–1412. doi:10.1095/biolreprod59.6.1406.

Pennington, KA, dan AD Ealy. 2012. Ekspresi dan Potensi fungsi protein morfogenetik tulang 2 dan 4 pada trofektoderm sapi.*mereproduksi. biologi. Endokrinol*. 10:12. doi:10.1186/1477-7827-10-12.

Pereira, RM, MC Baptista, MI Vasques, AE Horta, PV Portugal, RJ Bessa, JC Silva, MS Pereira, dan CC Marques. 2007. Cryosurvival blastokista sapi ditingkatkan dengan kultur dengan asam linoleat terkonjugasi trans-10 cis-12 (10t,12c CLA).*animasi. mereproduksi. Sains*. 98:293–301. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.03.015.

Phillips, DJ, dan DM de Kretser. 1998. Follistatin: multifungsi protein pengatur nasional.*Neuroendokrinol depan*. 19:287–322. doi:10.1006/frne.1998.0169.

Prelle, K., M. Stojkovic, K. Boxhammer, J. Motlik, D. Ewald, GJ Arnold, dan E. Wolf. 2001. Faktor pertumbuhan seperti insulin I (IGF-I) dan R(3)IGF-I panjang secara berbeda mempengaruhi perkembangan dan kelimpahan asam ribonukleat pembawa pesan untuk protein pengikat IGF dan reseptor IGF tipe I pada embrio sapi yang diproduksi secara in vitro. *Endokrinologi*. 142:1309–1316. doi:10.1210/endo.142.3.8038.

Pushpakumara, PG, RS Robinson, KJ Demmers, GE Mann, K. D. Sinclair, R. Webb, dan DC Wathes. 2002. Ekspresi sistem Insulin-Like Growth Factor (IGF) pada saluran telur sapi saat berahi dan pada awal kebuntingan.*Reproduksi*. 123:859–868. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12052240/.

Rajput, SK, C. Yang, M. Ashry, JK Folger, JG Knott, dan GW Smith. 2020. Peran sinyal protein morfogenetik tulang dalam perkembangan embrio awal sapi dan tindakan embriotropik spesifik tahap follistatin.*biologi. mereproduksi*. 102:795–805. doi:10.1093/biolre/ioz235.

Rho, NY, FA Ashkar, T. Revay, P. Madan, GJ Rho, WA King, dan LA Favetta. 2018. Transkripsi de novo pada reseptor hormon tiroid sangat penting untuk perkembangan awal embrio sapi secara in vitro. *mereproduksi. Subur. Dev*. 30:779–788. doi:10.1071/RD17165.

Rhoads, ML, JP Meyer, SJ Kolath, WR Lamberson, dan MC Lucy. 2008. Reseptor hormon pertumbuhan, insulin-like growth factor (IGF)-1, dan ekspresi IGF-binding protein-2 pada jaringan reproduksi sapi perah awal postpartum.*J. Ilmu Susu*. 91:1802–1813. doi:10.3168/jds.2007-0664.

Rivera, RM 2019. Konsekuensi dari teknik reproduksi berbantuan pada epigenom embrio pada sapi.*mereproduksi. Subur. Dev*. 32:65–81. doi:10.1071/RD19276.

Robinson, RS, GE Mann, TS Gadd, GE Lamming, dan DC jam tangan. 2000. Ekspresi sistem IGF pada rahim sapi sepanjang siklus estrus dan awal kehamilan.*J. Endokrinol*. 165:231–243. doi:10.1677/joe.0.1650231.

Rodriguez, A., C. De Frutos, C. Diez, JN Caamano, N. Facal, P. Duque, C. Garcia-Ochoa, dan E. Gomez. 2007a. Pengaruh faktor penghambat leukemia manusia versus tikus pada perkembangan in vitro embrio sapi.*Teriogenologi*. 67:1092–1095. doi:10.1016/j.theriogenologi.2006.11.015.

Rodriguez, A., C. Diez, JN Caamano, C. de Frutos, LJ Royo, M. Munoz, S. Ikeda, N. Facal, M. Alvarez-Viejo, dan E. Gomez. 2007b. Agonis spesifik reseptor retinoid mengatur perkembangan embrio awal sapi in vitro, diferensiasi dan ekspresi gen yang terkait dengan penghentian siklus sel dan apoptosis.*Teriogenologi*. 68:1118– 1127. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.08.007.

Rodriguez, A., C. Diez, S. Ikeda, LJ Royo, JN Caamano, C. Alonjadi-Montes, F. Goyache, I. Alvarez, N. Facal, dan E. Gomez. 2006. Retinoid selama transisi in vitro dari morula sapi ke blastokista. *Bersenandung. mereproduksi*. 21:2149–2157. doi:10.1093/humrep/del099. Roelen, BA, MJ Van Eijk, MA Van Rooijen, MM Bevers, J. H. Larson, HA Lewin, dan CL Mummery. 1998. Kloning molekul, pemetaan genetik, dan ekspresi perkembangan reseptor tipe I faktor pertumbuhan sapi yang mengubah beta (TGF-beta).*mol. mereproduksi. Dev*. 49:1–9. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199801)49:1<1::AID-MRD1>3.0.CO;2-U.

Rose-John, S. 2018. Sitokin keluarga Interleukin-6.*Pelabuhan Musim Semi Dingin. Perspektif. biologi*. 10. doi:10.1101/cshperspect.a028415. Saeed-Zidane, M., D. Tesfaye, Y. Mohammed Shaker, E. Tholen, C. Neuhoff, F. Rings, E. Held, M. Hoelker, K. Schellander, dan D. Salilew-Wondim. 2019. Asam hialuronat dan faktor pertumbuhan epidermal meningkatkan kualitas embrio sapi dengan mengatur metilasi DNA dan pola ekspresi jalur adhesi fokus. *PLoS Satu* 14:e0223753. doi:10.1371/jurnal.pone.0223753. Sakagami, N., H. Umeki, O. Nishino, H. Uchiyama, K. Ichikawa, K. Takeshita, E. Kaneko, K. Akiyama, S. Kobayashi, dan H. Tamada. 2012. Anak sapi normal dihasilkan setelah transfer embrio yang dikultur dalam media kimia yang dilengkapi dengan faktor pertumbuhan epidermal dan faktor pertumbuhan mirip insulin I setelah pengambilan sel telur dan fertilisasi in vitro pada sapi hitam Jepang. *J.Reproduksi. Dev*. 58:140–146. doi:10.1262/jrd.11-050m.

Sampaio, RV, S. Conceicao, MS Miranda, F. Sampaio Lde, dan O. M.Ohashi. 2012. Situs pengikatan melatonin MT3, reseptor melatonin MT1 dan MT2 terdapat pada oosit, namun hanya MT1 yang terdapat pada blastokista sapi yang diproduksi secara in vitro.*mereproduksi. biologi. Endokrinol*. 10:103. doi:10.1186/1477-7827-10-103.

Sang, L., W. Ortiz, Y. Xiao, E. Estrada-Cortes, EA Jannaman, dan PJ Hansen. 2020. Tindakan embriokin yang diduga terhadap perkembangan embrio sapi praimplantasi ke tahap blastokista.*J. Ilmu Susu*. 103:11930–11944. doi:10.3168/jds.2020-19068.

Scenna, FN, JL Edwards, NR Rohrbach, ME Hockett, A. M.Saxton, dan FN Schrick. 2004. Efek merugikan dari prostaglandin F2alpha pada embrio sapi praimplantasi. *Prostaglandin Mediat Lipid Lainnya*. 73:215–226. doi:10.1016/j.prostaglandin.2004.02.001.

Schultz, GA, A.Hogan, AJ Watson, RM Smith, dan S. Heyner. 1992. Insulin, faktor pertumbuhan mirip insulin dan transporter glukosa: pola temporal ekspresi gen pada embrio murine dan sapi awal.*mereproduksi. Subur. Dev*. 4:361–371. doi:10.1071/rd9920361.

Seekford, ZK, LK Wooldridge, NW Dias, CL Timlin, Penjualan AF, SL Speckhart, KG Pohler, RR Cockrum, VRG Mercadante, dan AD Ealy. 2021. Suplementasi Interleukin-6 meningkatkan perkembangan embrio dan janin pasca transfer dari embrio sapi yang diproduksi secara in vitro.*Teriogenologi*. 170:15–22. doi:10.1016/j. theriogenologi.2021.04.004.

Siemieniuch, MJ, M. Majewska, M. Takahashi, M. Sakatani, K. Lukasik, K. Okuda, dan DJ Skarzynski. 2010. Apakah faktor glukokortikoid bersifat auto dan/atau parakrin dalam perkembangan dan implantasi embrio sapi awal?*mereproduksi. biologi*. 10:249–256. doi:10.1016/s1642-431x(12)60045-x.

Siqueira, LG, dan PJ Hansen. 2016. Perbedaan jenis kelamin dalam respon embrio sapi ke faktor perangsang koloni 2.*Reproduksi*. 152:645–654. doi:10.1530/REP-16-0336.

Siqueira, LG, MVG Silva, JC Panetto, dan JH Viana. 2019. Kontrarangkaian teknologi reproduksi berbantuan untuk fungsi keturunan pada sapi.*mereproduksi. Subur. Dev*. 32:82–97. doi:10.1071/RD19278.

Sirisathien, S., dan BG Brackett. 2003. TUNEL Analisis sapi blastokista setelah dikultur dengan EGF dan IGF-I.*mol. mereproduksi. Dev*. 65:51–56. doi:10.1002/mrd.10263.

Sirisathien, S., HJ Hernandez-Fonseca, P. Bosch, BR Hollet, JD Lott, dan BG Brackett. 2003a. Pengaruh faktor penghambat leukemia pada embrio sapi yang diproduksi in vitro dalam kondisi yang ditentukan secara kimia.*Teriogenologi*. 59:1751–1763. doi:10.1016/s0093- 691x(02)01258-x.

Sirisathien, S., HJ Hernandez-Fonseca, dan BG Brackett. 2003b. Pengaruh faktor pertumbuhan epidermal dan faktor pertumbuhan mirip insulin-I terhadap perkembangan blastokista sapi in vitro.*animasi. mereproduksi. Sains*. 77:21–32. doi:10.1016/s0378-4320(02)00272-5.

Smith, LC, J. Therrien, F. Filion, F. Bressan, dan FV Meirelles. 2015. Konsekuensi epigenetik dari teknologi reproduksi buatan terhadap gen yang dicetak pada sapi SNRPN, H19/IGF2, dan IGF2R.*Depan. Genet*. 6:58. doi:10.3389/fgene.2015.00058.

Sosa, F., J. Block, Y. Xiao, dan PJ Hansen. 2020. Penentu surkelangsungan hidup blastokista sapi terhadap stres kriopreservasi: pengobatan dengan faktor perangsang koloni 2 selama transisi morula ke blastokista dan seks embrio.*KABI. Pertanian. biosci*. 1. lakukan:10.1186/s43170-020-00012-9.

Steinhart, Z., dan S. Angers. 2018. Tidak ada sinyal dalam pengembangan dan homeostatis jaringan.*Perkembangan*145.doi:10.1242/pengembangan.146589.

Stoecklein, KS, MS Ortega, LD Spate, CN Murphy, dan RS Prather. 2021. Peningkatan kriopreservasi embrio sapi yang diproduksi secara in vitro menggunakan FGF2, LIF, dan IGF1.*PLoS Satu*16:e0243727. doi:10.1371/jurnal.pone.0243727.

Thompson, JG, RJ Partridge, FD Houghton, CI Cox, dan H. J. Leese. 1996. Penyerapan oksigen dan metabolisme karbohidrat oleh embrio sapi yang diturunkan secara in vitro.*J.Reproduksi. Subur*. 106:299–306. doi:10.1530/jrf.0.1060299.

Tokarz, VL, PE MacDonald, dan A. Klip. 2018. Biologi sel gy fungsi insulin sistemik.*J. Biol Sel*. 217:2273–2289. doi:10.1083/jcb.201802095.

Tominaga, K., Y. Hamada, T. Yabuue, dan T. Ariyoshi. 2000. Pengaruh asam linoleat-albumin pada kelangsungan hidup embrio sapi yang diproduksi secara in vitro pada tahap 16 sel pasca pencairan.*J. Dokter Hewan Med. Sains*. 62:465–467. doi:10.1292/jvms.62.465.

Tordjman, S., S. Chokron, R. Delorme, A. Charrier, E. Bellissant, N. Jaafari, dan C. Fougerou. 2017. Melatonin: farmakologi, fungsi dan manfaat terapeutik.*Saat ini. Neurofarmakol*. 15:434–443. doi:10.2174/1570159X14666161228122115.

Torres, AC, D. Boruszewska, M. Batista, I. Kowalczyk-Zieba, P. Diniz, E. Sinderewicz, JS Saulnier-Blache, I. Woclawek-Potocka, dan L. Lopes-da-Costa. 2014. Pensinyalan asam lisofosfatidat pada embrio sapi tahap pembelahan akhir dan blastokista.*Peradangan Mediator*. 2014:678968. doi:10.1155/2014/678968.

Tribulo, P., BH Bernal Ballesteros, A. Ruiz, A. Tribulo, RJ Tribulo, HE Tribulo, GA Bo, dan PJ Hansen. 2017a. Konsekuensi paparan embrio yang diproduksi in vitro dalam media yang mengandung serum terhadap protein 1 terkait dickkopf dan faktor perangsang koloni 2 terhadap hasil blastokista, tingkat kehamilan, dan berat lahir. *J.Anim. Sains*. 95:4407–4412. doi:10.2527/jas2017.1927.

Tribulo, P., G. Jumatayeva, K. Lehloenya, JI Moss, VM Negron-Perez, dan PJ Hansen. 2018a. Pengaruh jenis kelamin terhadap respon embrio praimplantasi sapi terhadap faktor pertumbuhan mirip insulin 1, aktivin A, dan WNT7A.*Pengembang BMC. biologi*. 18:16. doi:10.1186/s12861-018-0176-2.

Tribulo, P., B. Leao, KC Lehloenya, GZ Mingoti, dan PJ Hansen. 2017b. Konsekuensi dari sinyal WNT endogen dan eksogen untuk pengembangan embrio sapi praimplantasi.*biologi. mereproduksi* . 96:1129–1141. doi:10.1093/biolre/iox048.

Tribulo, P., JI Moss, M. Ozawa, Z. Jiang, XC Tian, dan PJ Hansen. 2017c. Regulasi WNT terhadap perkembangan embrio kemungkinan besar melibatkan jalur yang tidak bergantung pada nuklir CTNNB1. *Reproduksi*. 153:405–419. doi:10.1530/REP-16-0610.

Tribulo, P., MB Rabaglino, MB Bo, LR Carvalheira, JV Uskup, TR Hansen, dan PJ Hansen. 2019. Protein 1 terkait Dickkopf adalah progestomedin yang bekerja pada embrio sapi selama transisi morula ke blastokista untuk memprogram pemanjangan trofoblas.*Sains. Reputasi*. 9:11816. doi:10.1038/s41598-019-48374-z.

Tribulo, P., LGB Siqueira, LJ Oliveira, T. Scheffler, dan PJ Hansen. 2018b. Identifikasi potensi embrio pada sapi

saluran reproduksi.*J. Ilmu Susu*. 101:690–704. doi:10.3168/jds.2017-13221.

Trigal, B., E. Gomez, C. Diez, JN Caamano, D. Martin, S. Carrocera, dan M.Munoz. 2011. Pengembangan in vitro embrio sapi yang dikultur dengan aktivin A.*Teriogenologi*. 75:584–588. doi:10.1016/j.theriogenologi.2010.09.010.

Ushijima, H., K. Akiyama, dan T. Tajima. 2008. Transisi nomor sel-bers dalam embrio praimplantasi sapi: embrio yang dikumpulkan secara in vivo dan diproduksi secara in vitro.*J.Reproduksi. Dev.* 54:239–243. doi:10.1262/jrd.19128.

Vailes, MT, SR McCoski, LK Wooldridge, ST Reese, KG Pohler, DA Roper, VR Mercadante, dan AD Ealy. 2019. Hasil pasca transfer pada embrio sapi yang dikultur yang dilengkapi dengan faktor pertumbuhan epidermal, faktor pertumbuhan fibroblas 2, dan faktor pertumbuhan mirip insulin 1.*Teriogenologi*. 124:1–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.09.023.

Vejlsted, M., B. Avery, JO Gjorret, dan P. Maddox-Hyttel. 2005. Efek faktor penghambat leukemia (LIF) pada embrio sapi yang diproduksi secara in vitro dan koloni pertumbuhannya.*mol. mereproduksi. Dev.* 70:445–454.doi:10.1002/mrd.20221.

Viana, JH 2019. Statistik produksi dan transfer embrio tahun 2019 pada hewan ternak domestik.*Buletin Teknologi Embrio*. 38:1–15. https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee. Viuff, D., P. Hyttel, T. Greve, T. Eriksen, dan S. Alexandersen. 1995. Transkripsi dan lokalisasi faktor pertumbuhan mRNA di saluran telur sapi.*mol. mereproduksi. Dev.* 42:28–34. doi:10.1002/mrd.1080420105.

Wang, F., X. Tian, L. Zhang, C. Gao, C. He, Y. Fu, P. Ji, Y. Li, N. Li, dan G.Liu. 2014a. Efek menguntungkan melatonin pada perkembangan embrio sapi in vitro dimediasi oleh reseptor melatonin 1.*J. Pineal Res*. 56:333–342. doi:10.1111/jpi.12126.

Wang, F., X. Tian, Y. Zhou, D. Tan, S. Zhu, Y. Dai, dan G. Liu. 2014b. Melatonin meningkatkan kualitas embrio sapi yang diproduksi secara in vitro (IVP): implikasi terhadap perkembangan blastokista, kriotoleransi, dan modifikasi ekspresi gen yang relevan.*PLoS Satu* 9:e93641. doi:10.1371/jurnal.pone.0093641.

Wang, LM, HL Feng, Y. Ma, M. Cang, HJ Li, Z. Yan, P. Zhou, JX Wen, S.Bou, dan DJ Liu. 2009. Ekspresi reseptor IGF dan ligannya pada oosit sapi dan embrio praimplantasi.*animasi. mereproduksi. Sains*. 114:99–108. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.019 Wang, RN, J. Green, Z. Wang, Y. Deng, M. Qiao, M. Peabody, Q. Zhang, J.Ye, Z.Yan, S. Denduluri, dkk. 2014c. Sinyal protein morfogenetik tulang (BMP) dalam perkembangan dan penyakit manusia. *Gen. Dis*. 1:87–105. doi:10.1016/j.gendis.2014.07.005.

Woclawek-Potocka, I., J. Komiyama, JS Saulnier-Blache, E. Brzezicka, MM Bah, K. Okuda, dan DJ Skarzynski. 2009. Asam lisofosfat memodulasi sekresi prostaglandin di rahim sapi.*Reproduksi*. 137:95–105. doi:10.1530/REP-08-0209. Wooldridge, LK, dan AD Ealy. 2019. Interleukin-6 Meningkatkan-jumlah massa sel dalam embrio sapi.*Pengembang BMC. biologi*. 19:2. doi:10.1186/s12861-019-0182-z.

Wooldridge, LK, dan AD Ealy. 2021a. Interleukin-6 Mempromosikan primer perkembangan endoderm positif pada blastokista sapi.*Pengembang BMC. biologi* . 21:3. doi:10.1186/s12861-020-00235-z.

Wooldridge, LK, dan AD Ealy. 2021b. Faktor penghambat leukemia merangsang ekspansi endoderm primitif pada massa sel bagian dalam sapi.*Depan. animasi. Sains*. 2:1–9. doi:10.3389/fanim.2021.796489.

Wooldridge, LK, SE Johnson, RR Cockrum, dan AD Ealy. 2019. Interleukin-6 Membutuhkan JAK untuk merangsang ekspansi massa sel dalam embrio sapi.*Reproduksi*. 158(4):303–312. doi:10.1530/REP-19-0286.

Wydooghe, E., S. Heras, J. Dewulf, S. Piepers, E. Van den Abbeel, P. De Sutter, L. Vandaele, dan A. Van Soom. 2014. Mengganti serum dalam media kultur dengan albumin dan insulin, transferin dan selenium adalah kunci keberhasilan pengembangan embrio sapi dalam kultur individu.*mereproduksi. Subur. Dev.* 26:717–724. doi:10.1071/RD13043.

Xie, H., S. Tranguch, X. Jia, H. Zhang, SK Das, SK Dey, CJ Kuo, dan H.Wang. 2008. Inaktivasi sinyal nuklir wnt-beta-catenin membatasi kompetensi blastokista untuk implantasi.*Perkembangan* 135:717–727. doi:10.1242/dev.015339

Xie, M., SR McCoski, SE Johnson, ML Rhoads, dan AD Ealy. 2017. Efek kombinatorial faktor pertumbuhan epidermal, faktor pertumbuhan fibroblas 2 dan faktor pertumbuhan mirip insulin 1 terhadap proliferasi sel trofoblas dan embriogenesis pada sapi.*mereproduksi. Subur. Dev.* 29:419–430. doi:10.1071/RD15226.

Yamanaka, Y., F. Lanner, dan J. Rossant. 2010. Ketergantungan Sinyal FGF pemisahan endoderm primitif dan epiblas pada blastokista tikus. *Perkembangan*137:715–724. doi:10.1242/dev.043471 Yang, BK, X. Yang, dan RH Foote. 1993. Pengaruh faktor pertumbuhan tor pada pengembangan morula dan blastokista oosit sapi yang matang secara in vitro dan dibuahi secara in vitro.*Teriogenologi*. 40:521–530. doi:10.1016/0093-691x(93)90405-t.

Yang, QE, SD Fields, K. Zhang, M. Ozawa, SE Johnson, dan AD awal. 2011a. Faktor pertumbuhan fibroblas 2 mendorong perkembangan endoderm primitif pada pertumbuhan blastokista sapi.*biologi. mereproduksi*. 85:946–953. doi:10.1095/biolreprod.111.093203.

Yang, QE, MI Giassetti, dan AD Ealy. 2011b. Pertumbuhan fibroblas faktor mengaktifkan jalur protein kinase yang diaktifkan mitogen untuk mendorong migrasi dalam sel trofoblas ovine.*Reproduksi*. 141:707– 714.doi:10.1530/REP-10-0541.

Yang, QE, SE Johnson, dan AD Ealy. 2011c. Protein kinase C delta memediasi ekspresi interferon-tau yang diinduksi faktor pertumbuhan fibroblas-2 pada trofoblas sapi.*biologi. mereproduksi*. 84:933–943. doi:10.1095/biolreprod.110.087916.

Yaseen, MA, C. Wrenzycki, D. Herrmann, JW Carnwath, dan H. Niemann. 2001. Perubahan kelimpahan relatif transkrip mRNA untuk ligan faktor pertumbuhan mirip insulin (IGF-I dan IGF-II) dan reseptornya (IGF-IR/IGF-IIR) pada embrio sapi praimplantasi yang berasal dari sistem in vitro yang berbeda.*Reproduksi*. 122:601–610. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11570968/.

Yoshioka, K., dan H. Kamomae. 1996. Aktivin manusia rekombinan A merangsang perkembangan embrio satu sel sapi yang matang dan dibuahi secara in vitro.*mol. mereproduksi. Dev.* 45:151–156. doi:10.1002/ (SICI)1098-2795(199610)45:2<151::AID-MRD7>3.0.CO;2-S.

Yoshioka, K., M. Takata, T. Taniguchi, H. Yamanaka, dan K. Sekikawa. 1998. Ekspresi diferensial subunit aktivin, reseptor aktivin, dan gen follistatin pada oosit sapi dan embrio praimplantasi. *mereproduksi. Subur. Dev.* 10:293–298. doi:10.1071/r98011.

Yu, B., HTA van Tol, CHY Oei, TAE Stout, dan BAJ Roelen. 2021. Asam lisofosfatidat mempercepat pembentukan blastokista yang diproduksi sapi secara in vitro melalui jalur Hippo/YAP.*Int. J.Mol. Sains*. 22. doi:10.3390/ijms22115915.

Zhang, K., SK Rajput, KB Lee, D. Wang, J. Huang, JK Folger, JG Knott, J.Zhang, dan GW Smith. 2015. Bukti yang mendukung peran SMAD2/3 dalam perkembangan embrio awal sapi: implikasi potensial terhadap tindakan embriotropik follistatin.*biologi. mereproduksi*. 93:86. doi:10.1095/biolreprod.115.130278.

Zhenhua, G., SK Rajput, JK Folger, L.Di, JG Knott, dan GW Smith. 2017. Perawatan follistatin sebelum dan sesudah/sesudah pemadatan meningkatkan produksi embrio sapi secara in vitro.*PLoS Satu* 12:e0170808. doi:10.1371/jurnal.pone.0170808.

Zolini, AM, J. Block, MB Rabaglino, P. Tribulo, M. Hoelker, G. Rincon, JJ Bromfield, dan PJ Hansen. 2020. Sidik jari molekuler embrio sapi betina yang diproduksi secara in vitro dengan kompetensi tinggi untuk membentuk dan mempertahankan kebuntingan belati.*biologi. mereproduksi*. 102:292–305. doi:10.1093/biolre/ioz190.

dokter hewan
ilmu pengetahuan

MDPI

Artikel

Ekspresi Gen yang Distimulasi Interferon pada Leukosit Darah Perifer sebagai Penanda Prediksi yang Nyaman untuk Status Embrio pada Sapi Hitam Jepang yang Ditransfer Embrio selama Periode Peri-Implantasi

Hitomi Yoshino[1,†], Keiichiro Kizaki[1,*], Toh-ichi Hirata[2], Kosuke Iga[3,‡], Hideo Matsuda[4], Tadayuki Yamanouchi[4], Yutaka Hashiyada[4,§], Kei Imai[5], Toshina Ishiguro-Oonuma[1], Tomomi Kanazawa[1], Toru Takahashi[1] dan Kazuyoshi Hashizume[1]

1 Departemen Koperasi Kedokteran Hewan, Fakultas Pertanian, Universitas Iwate, 3-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Iwate, Jepang; yoshino1990710@gmail.com (HY); oonumat@iwate-u.ac.jp (TI-O.); tomomik@iwate-u.ac.jp (TK); tatoru@iwate-u.ac.jp (TT); kazuha@iwate-u.ac.jp (KH)
2 Field Science Center, Fakultas Pertanian, Universitas Iwate, 3-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Iwate, Jepang; hirata@iwate-u.ac.jp
3 Pusat Penelitian Pertanian Tohoku, Organisasi Penelitian Pertanian dan Pangan Nasional, 4 Akahira, Shimo-kuriyagawa, Morioka 020-0198, Iwate, Jepang; kosukei@affrc.go.jp
4 Pusat Pembibitan Ternak Nasional, Nishigo 961-8061, Fukushima, Jepang; h0matsud@nlbc.go.jp (HM); t0yamano@nlbc.go.jp (TY); yhashiy@ishikawa-pu.ac.jp (YH)
5 Departemen Pertanian Berkelanjutan, Universitas Rakuno Gakuen, 582 Bunkyodai-Midorimachi, Ebetsu 069-8501, Hokkaido, Jepang; imai@rakuno.ac.jp
* Korespondensi: kizaki@iwate-u.ac.jp †
‡ Alamat sekarang: Layanan Klinis Sapi Kohiruimaki, 63-3 Ohira, Tohoku 039-2683, Aomori, Jepang. Alamat saat ini: Institut Ilmu Peternakan dan Padang Rumput, Organisasi Penelitian Pertanian dan Pangan Nasional, Ikenodai 2, Tsukuba 305-8602, Ibaraki, Jepang.
§ Alamat saat ini: Departemen Ilmu Bioproduksi, Fakultas Sumber Daya Hayati dan Ilmu Lingkungan, Universitas Prefektur Ishikawa, Nonoichi 921-8836, Ishikawa, Jepang.

check for updates

Kutipan: Yoshino, H.; Kizaki, K.; Hirata, T.-i.; Iga, K.; Matsuda, H.; Yamanouchi, T.; Hashiyada, Y.; Imai, K.; Ishiguro-Oonuma, T.; Kanazawa, T.; dkk. Ekspresi Gen yang Distimulasi Interferon dalam Leukosit Darah Perifer sebagai Kenyamanan Penanda Prediksi Status Embrio pada Sapi Hitam Jepang yang Ditransfer Embrio pada Masa Periode Peri-Implantasi. *Dokter hewan. Sains.* **2023**, *10*, 408. https://doi.org/10.3390/vetsci10070408

Editor Akademik: Burim Ametaj

Diterima: 24 Mei 2023
Direvisi: 19 Juni 2023
Diterima: 20 Juni 2023
Diterbitkan: 22 Juni 2023

Hak cipta: © 2023 oleh penulis. Pemegang Lisensi MDPI, Basel, Swiss. Artikel ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah syarat dan ketentuan lisensi Creative Commons Attribution (CC BY) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Ringkasan Sederhana: Secara praktis dan ekonomi, memprediksi status kebuntingan sangat penting dalam produksi pangan hewani. Baru-baru ini, ekspresi gen terstimulasi interferon (ISGs) dalam leukosit darah tepi telah diperiksa sebagai biomarker untuk memprediksi status kehamilan selama pengenalan ibu pada hewan ruminansia. Meskipun kadar ISG dalam sel darah sapi telah dilaporkan, penerapan praktis metode deteksi ini pada sapi yang ditransfer embrio (ET) belum dievaluasi secara rinci. Kadar tiga dari empat ISG dalam penelitian ini secara signifikan lebih tinggi pada sapi bunting dibandingkan sapi tidak bunting pada hari ke 21 kebuntingan. Hasil kinerja diagnostik menunjukkan bahwa ketiga ISG merupakan biomarker yang tepat untuk memprediksi status kehamilan sapi ET. Evaluasi statistik akurasi diagnostik pada sapi ET menunjukkan bahwa nilai sensitivitas, spesifisitas, dan akurasi sangat tinggi dan diperkirakan nilai prediksi positif dari ketiga ISG. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ISG merupakan biomarker yang baik untuk status kehamilan selama periode peri-implantasi pada sapi ET.

Abstrak: Diagnosis kebuntingan pada awal kehamilan penting untuk reproduksi ternak. Ekspresi gen terstimulasi interferon (ISGs) dalam leukosit darah tepi (PBLs) dipelajari pada sapi Hitam Jepang yang ditransfer embrio (ET). ISG di PBL—*ISG15*, *MX1*, *MX2*, Dan *OAS1*— dideteksi pada sapi ET yang mengalami ovulasi ganda menggunakan reaksi berantai polimerase kuantitatif waktu nyata, dan analisis kurva karakteristik operasi penerima (ROC) dilakukan. Status kehamilan diprediksi menggunakan rata-rata kadar ISG selama siklus estrus normal (AVE) dan indeks Youden dari analisis kurva ROC sebagai nilai batas. Itu *ISG15*, *MX1*, Dan *MX2* kadarnya secara signifikan lebih tinggi pada sapi bunting (N=10) dibandingkan pada sapi yang tidak bunting (N=23) pada hari kebuntingan ke-21, sedangkan kadar semua ISG serupa antara sapi tidak bunting dan sapi tidak bunting yang mengalami kematian embrio terlambat (N=7). *ISG15*, *MX1*, Dan *MX2* memprediksi dengan tepat status kehamilan sapi ET. Evaluasi statistik akurasi diagnostik pada sapi ET pada hari ke 21 kebuntingan disajikan

nilai sensitivitas, spesifisitas, akurasi, dan nilai prediksi positif yang lebih tinggi *ISG15, MX1*, Dan *MX2* menggunakan indeks Youden dibandingkan menggunakan AVE. Karena itu, *ISG15*, *MX1*, Dan *MX2* merupakan biomarker yang sangat baik untuk status kehamilan selama periode peri-implantasi pada sapi ET.

Kata kunci: diagnosis kehamilan; status kehamilan; penanda biologis

---

1. Perkenalan

Interferon-tau (IFNT) adalah molekul unik yang berasal dari sel trofoblas pada hewan ruminansia dan diproduksi secara khusus pada masa awal kehamilan [1–3]. IFNT memberikan efek anti-luteolitik pada korpus luteum dengan melemahkan sekresi prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) di endometrium, dan sekresi PGF2 alpha dimediasi oleh penurunan regulasi reseptor oksitosin di sel epitel uterus.1–3]. IFNT tidak hanya merangsang sel-sel endometrium dan luteal tetapi juga sel-sel lain, seperti hepatosit dan sel darah [3–7]. Ia mengenali kehamilan dan memainkan peran imunologis dalam mencegah infeksi dan interaksi embrio-ibu [8,9]. Ini memainkan peran penting dalam regulasi faktor embrio dan endometrium selama awal kehamilan pada ruminansia.

Gen yang distimulasi interferon (ISG) diinduksi sebagai respons terhadap interferon (IFN) [10]. IFNT, suatu IFN tipe I, berikatan dengan kompleks heterodimeric interferon alpha dan beta receptor (IFNAR) 1/IFNAR2 di permukaan sel.3]. Pensinyalan IFNT, melalui Janus kinase/transduser sinyal dan jalur aktivator transkripsi (JAK/STAT), melibatkan heterotrimer transkripsional yang terdiri dari STAT1/STAT2 terfosforilasi dan faktor pengatur interferon (IRF9) [3]. Faktor pengatur interferon 3 yang teraktivasi, yang terdiri dari STAT1/STAT2 dan IRF9 terfosforilasi, bertranslokasi ke nukleus dan mendorong transkripsi gen dengan mengikat elemen respons yang distimulasi IFN di daerah promotor hulu ISGs [11]. Sebelumnya diperkirakan terdapat beberapa ratus ISG; namun, dalam beberapa tahun terakhir, diperkirakan sekitar 10% gen dalam genom diatur oleh IFN [12]. Pengubah mirip ubiquitin ISG15 (*ISG15*), GTPase 1 seperti dinamin MX (*MX1*), *MX2*, dan 2'–5' oligoadenilat sintetase 1 (*OAS1*), yang menjadi fokus penelitian ini, adalah ISG yang khas [11]. ISG dan molekul terkaitnya mengoordinasikan pembentukan interaksi fetomaternal dan secara bersamaan merangsang sel darah. Respons spesifik ini dapat bermanfaat untuk memprediksi status kehamilan sapi selama periode awal peri-implantasi, karena IFNT memainkan peran spesifik pada ruminansia [2]. Peristiwa kompleks ini tampaknya berkaitan erat dengan ekspresi ISG dalam sel darah selama pengenalan ibu.

Memprediksi status kebuntingan sangat penting dalam produksi pangan hewani, baik secara praktis maupun ekonomis. Berbagai metode prediksi kehamilan, termasuk palpasi rektal, ultrasonografi, pengukuran kadar progesteron darah, dan deteksi estrus, telah digunakan untuk mengatasi masalah kritis ini pada sapi [13–15]. Deteksi kembalinya estrus pada hari ke 18-32 pasca inseminasi buatan (AI) merupakan metode yang paling mudah untuk mengidentifikasi sapi yang tidak bunting.13]; namun, metode ini tidak cukup akurat untuk diagnosis kehamilan karena efisiensinya yang rendah (<50%) [16]. Diagnosis berdasarkan palpasi rektal pada ovarium dan uterus adalah metode yang paling banyak digunakan, dan dapat dilakukan dengan benar sejak 35 hari pasca AI [13,14]. Baru-baru ini, ultrasonografi mode kecerahan (B) portabel telah dilaporkan menjadi metode yang tersebar luas, dan telah digunakan untuk mendeteksi kehamilan dini dengan benar 27 hari pasca AI dalam kondisi dunia nyata [13,17]. Selain itu, metode tidak langsung, seperti pengukuran konsentrasi progesteron dan kadar glikoprotein terkait kehamilan (PAG) dalam susu dan darah, telah dikembangkan [13–15]. Pembuatan profil konsentrasi progesteron pada hari ke 18-24 pasca AI dapat menjadi metode yang efektif untuk mengidentifikasi sapi yang tidak bunting [13]. Namun, sapi yang tidak bunting dengan fase luteal yang diperpanjang didiagnosis bunting. Oleh karena itu, tes progesteron tidak cukup untuk mengidentifikasi sapi bunting [13]. PAG disekresi oleh sel trofoblas berinti dua di plasenta, dan kadarnya meningkat pada usia kehamilan 15 hingga 35 hari pada sapi.13,18]. Kit pengujian untuk susu

dan kadar PAG darah baru-baru ini dikomersialkan. Kadar PAG dalam susu dan darah merupakan indikator yang dapat diandalkan untuk diagnosis kehamilan sekitar 26-30 hari pasca AI [13,14].

Dalam penelitian yang disebutkan di atas, diagnosis yang benar dibuat setelah periode estrus kembali normal, dan dengan demikian, peluang kawin ulang dini mungkin hilang pada sapi yang tidak bunting. Oleh karena itu, penetapan metode diagnosis kehamilan sebelum akhir siklus estrus diperlukan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi. Selain itu, deteksi dan prediksi keguguran (kematian embrio lanjut atau aborsi) setelah diagnosis awal kehamilan sulit dilakukan; oleh karena itu, diperlukan beberapa pemeriksaan untuk memastikan status kehamilan. Namun, IFNT merupakan molekul spesifik yang sulit digunakan sebagai sinyal prediksi kehamilan selama periode awal implantasi; meskipun demikian, hal itu memainkan peran di kemudian hari [1,2,19]. Baru-baru ini, ekspresi ISG pada leukosit darah tepi (PBL) telah diperiksa sebagai biomarker untuk memprediksi status kehamilan selama pengenalan ibu pada hewan ruminansia [20–22]. Efisiensi prediksi ISG, khususnya*ISG15*Dan*MX2*, karena pembentukan kebuntingan telah dikonfirmasi sebagai biomarker yang dapat diandalkan pada sapi [21,23–26].

Transfer embrio adalah teknologi reproduksi berbantuan yang berbeda dari AI dan telah dikembangkan dan digunakan dalam industri makanan dan peternakan [14,27]. Pemindahan embrio adalah metode yang digunakan untuk mendorong perbaikan ternak dan menghasilkan hewan dengan nilai pasar yang tinggi; namun, angka konsepsi masih harus ditingkatkan karena hanya sekitar setengah dari transfer embrio yang berhasil dalam praktiknya [28–30]. Dalam transfer embrio, seperti pada AI, diagnosis kebuntingan dini, terutama identifikasi sapi yang tidak bunting, meningkatkan kemungkinan inseminasi dan memperpendek interval beranak, sehingga meningkatkan efisiensi reproduksi.*ISG15*ekspresi dalam PBL, sebuah biomarker untuk memprediksi status kehamilan selama pengenalan ibu, telah dilaporkan meningkat pada sapi yang ditransfer embrio (ET) [31,32]. Namun, penerapan praktis metode deteksi ini belum dievaluasi secara rinci.

Oleh karena itu, dalam penelitian ini, kami bertujuan untuk memperjelas pola ekspresi empat ISG [*ISG15*, *MX1*,*MX2*, Dan*OAS1*] pada PBL sapi multiple ovulation embrio transfer (MOET) pada hari ke 21 setelah estrus (14 hari setelah transfer embrio) dan untuk memverifikasi metode prediksi status kebuntingan pada sapi ET Japanese Black (JB) selama periode peri-implantasi.

2. Bahan-bahan dan metode-metode

2.1. Hewan

Komite Perawatan dan Penggunaan Hewan Laboratorium Universitas Iwate menyetujui kondisi percobaan dan pemberian pakan ternak yang digunakan dalam penelitian ini (nomor persetujuan: A201244, A201434, dan A201701). Dua puluh dua ekor sapi dara dan delapan belas ekor sapi JB parous (N=40) dari peternakan percobaan digunakan dalam penelitian ini. Blastokista sapi diproduksi pada hari ke 7 menggunakan teknik MOET [33]. Embrio yang dapat dipindahkan, yang diidentifikasi menurut manual International Embryo Transfer Society sebagai kode 1 atau 2 blastokista tunggal pada hari ke 7 setelah inseminasi, dipindahkan ke tanduk rahim ipsilateral ke tanduk korpus luteum dari masing-masing penerima yang disinkronkan pada hari ke 7 setelah estrus, seperti sebelumnya dilaporkan [34]. Perilaku penerima estrus diamati minimal dua kali sehari, pada pagi dan sore hari. Darah tepi dikumpulkan pada hari ke 21 kehamilan (14 hari setelah transfer embrio). Status kehamilan dikonfirmasi pada usia kehamilan 30 dan 60 hari menggunakan deteksi ultrasonografi (UD). Dalam penelitian ini, tiga kategori sapi yang berbeda, yaitu 10 sapi ET bunting, 23 sapi tidak bunting, dan 7 sapi tidak bunting dengan kematian embrio terlambat, dimasukkan dari peternakan percobaan. Pada sapi ET bunting, konseptus diamati menggunakan UD sekitar 30 hari (23 hari setelah transfer embrio) dan 60 hari kebuntingan. Sebaliknya, pada sapi ET yang tidak bunting, tidak terjadi konsepsi pada hari ke 30 dan 60. Keguguran pada sapi dalam penelitian ini terjadi setelah konseptus diamati pada hari ke 30 kebuntingan. Dengan demikian, konseptus diamati pada hari ke 30 tetapi tidak pada hari ke 60 pada kelompok kematian embrio akhir.

2.2. Pengumpulan Sampel, Ekstraksi RNA, dan Reaksi Rantai Polimerase Kuantitatif Waktu Nyata (RT-qPCR)

Pengumpulan darah, ekstraksi RNA, dan RT-qPCR dilakukan seperti yang dijelaskan sebelumnya [26]. Sekitar 3 mL darah tepi dikumpulkan dalam tabung RNA darah PAXgene (Qiagen, Hilden, Jerman) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 jam. RNA diekstraksi menggunakan kit ekstraksi RNA (PAXgene Blood RNA Kit; Qiagen). Sampel RNA dievaluasi menggunakan spektrofotometer NanoDrop (ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dan diobati dengan DNase (Kit bebas DNA TURBO; Ambion, Austin, TX, USA) untuk menghilangkan DNA genom yang terkontaminasi. Transkripsi terbalik dilakukan menggunakan 1mikrog total RNA dengan primer acak dan kit transkripsi balik berkapasitas tinggi (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sesuai dengan instruksi pabrik. Siklus transkripsi terbalik dilakukan pada 25◦C selama 10 menit, 37◦C selama 120 menit, dan 85◦C selama 5 detik dalam thermal cycler. Analisis PCR dilakukan menggunakan Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) pada sistem PCR real-time ABI7300 (Applied Biosystems), seperti yang dijelaskan sebelumnya [24]. Primer yang digunakan untuk memperkuat setiap gen tercantum dalam Tabel1[24]. Kondisi amplifikasi adalah sebagai berikut: inkubasi sampel awal pada 50◦C selama 2 menit dan 95◦C selama 10 menit, dilanjutkan dengan 40 siklus pada suhu 95◦C selama 15 detik dan 60◦C selama 1 menit, dengan pengumpulan sinyal fluoresensi pada akhir setiap siklus. Kurva leleh untuk mendeteksi amplikon objektif berbasis SYBR Green dikonfirmasi pada 65 hingga 95◦C dalam 0,5◦kenaikan C. Untuk mengukur konsentrasi masing-masing mRNA, kurva standar dihasilkan melalui pengenceran serial plasmid yang mengandung cDNA yang sesuai, seperti yang dijelaskan sebelumnya [22]. Untuk persiapan plasmid standar, fragmen PCR disubklon ke dalam Sistem Vektor Mudah pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA), sesuai dengan instruksi pabrik, dan urutan plasmid kloning yang mengandung cDNA dianalisis menggunakan ABI PRISM 3100- Avant Genetic Analyzer (Biosistem Terapan). Selain itu, ekspresi mRNA dari gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase (*GAPDH*) digunakan sebagai gen referensi untuk normalisasi ekspresi internal dalam sampel. Ekspresi beta-aktin dan protein ribosom L27, selain itu*GAPDH*, juga diperiksa untuk mengevaluasi penggunaannya sebagai gen referensi untuk RT-qPCR. Hasilnya tidak menunjukkan perbedaan ekspresi yang signifikan. PCR kuantitatif dilakukan sesuai dengan pedoman Informasi Minimum untuk Publikasi Eksperimen PCR Kuantitatif Real-Time (MIQE) [35].

Tabel 1. Urutan primer untuk RT-qPCR.

Gen	Nomor Aksesi	Untai	Urutan (5′–3′)
ISG15	NM_174366	Maju	GCAGACCAGTTCTGGCTGTCT
		Balik	CCAGCGGGGTGCTCATCAT
MX1	NM_173940	Maju	GAGGTGGACCCCCAAGGA
		Balik	CCACCAGATCGGGCTTTGT
MX2	NM_173941	Maju	GGGCAGCGGAATCATCAC
		Balik	CTCCCGCTTTGTCAGTTTCAG
OAS1	NM_178108	Maju	CCAAGTCAAACAAGCCATCGA
		Balik	CACATCGGAAACACCTCTCCTT
GAPDH	NM_001034034	Maju	AAGGCCATCACCATCTTCCA
		Balik	CCACCACATACTCAGCACCAGCAT

2.3. Estimasi Nilai Ambang Batas

Nilai rata-rata (AVE) tingkat ekspresi ISG yang dinormalisasi selama siklus estrus pada sapi JB telah dilaporkan sebelumnya [26] sebagai berikut:*ISG15*, 0,174;*MX1*, 0,065; *MX2*, 0,098; Dan*OAS1*, 0,351. Tingkat ekspresi ISG pada hari ke 21 kebuntingan pada sapi ET digunakan untuk membuat kurva receiver operating character (ROC). Menurut percobaan RT-qPCR dalam penelitian ini, referensi cDNA untuk*ISG15*,*MX1*,*MX2*, Dan *OAS1*dan sampel cDNA yang disintesis dari PBL RNA diukur secara bersamaan untuk memungkinkan perbandingan dengan nilai AVE yang diperoleh pada penelitian sebelumnya. Indeks Youden dan

area di bawah kurva ROC (AUC) diperkirakan menggunakan perangkat lunak JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Indeks AVE dan Youden digunakan sebagai nilai ambang batas untuk memprediksi keakuratan diagnosis kebuntingan pada sapi ET pada hari kebuntingan ke-21. Hasilnya adalah sebagai berikut: true positif (TP), dimana status kehamilan ditentukan positif menggunakan nilai batas AVE atau indeks Youden dan dengan penggunaan UD pada usia kehamilan sekitar 60 hari; positif palsu (FP), dimana status kehamilan ditentukan positif menggunakan nilai batas AVE atau indeks Youden tetapi negatif menggunakan UD; true negative (TN), dimana status kehamilan ditentukan negatif dengan menggunakan nilai batas AVE atau indeks Youden dan UD; dan false negative (FN), dimana status kehamilan ditentukan negatif menggunakan nilai batas AVE atau indeks Youden tetapi positif menggunakan UD. Sensitivitas (TP/(TP + FN)×100 (probabilitas diagnosis kebuntingan pada sapi yang benar-benar bunting)), spesifisitas)TN/(TN + FP)×100 (probabilitas sapi terdiagnosis tidak bunting)), nilai prediksi positif (PPV; TP/(TP + FP)×100), dan nilai prediksi negatif (NPV; TN/(TN + FN)×100) dihitung. Keakuratan penentuan kehamilan, (TP + TN)/(TP + FP + TN + FN)×100, dievaluasi dengan menghitung akurasi diagnostik.

2.4. Analisis statistik

Ekspresi gen diukur menggunakan RT-qPCR dan dianalisis menggunakan uji Kruskal – Wallis, dilanjutkan dengan uji Steel – Dwass, menggunakan software JMP 7. Hasil dengan $P<0,05$ dianggap signifikan.

3. Hasil

3.1. Ekspresi ISG Klasik pada Sapi ET dan Analisis Kurva ROC

Ekspresi dari *ISG15*, *MX1*, Dan *MX2* secara signifikan lebih tinggi pada sapi bunting dibandingkan sapi tidak bunting pada hari ke 21 kebuntingan; Namun, tidak ada perbedaan yang diamati *OAS1* ekspresi (Tabel 2). Ekspresi sebagian besar ISG serupa antara kelompok kematian embrio tidak hamil dan akhir embrio.

Meja 2. Ekspresi gen terstimulasi interferon (ISGs) pada leukosit darah tepi (PBLs) sapi Japanese Black (JB) yang bunting dan tidak bunting pada hari ke 21 kebuntingan (14 hari setelah transfer embrio).

Kelompok	*N*	*ISG15*	*MX1*	*MX2*	*OAS1*
Hamil	10	0,71±0,10A	0,28±0,03A	0,64±0,09A	0,66±0,19
Tidak hamil	23	0,20±0,05B	0,13±0,02B	0,25±0,06B	0,37±0,06
Tidak hamil dengan terlambat kematian embrio	7	0,26±0,12B	0,15±0,03B	0,27±0,09B	0,18±0,04

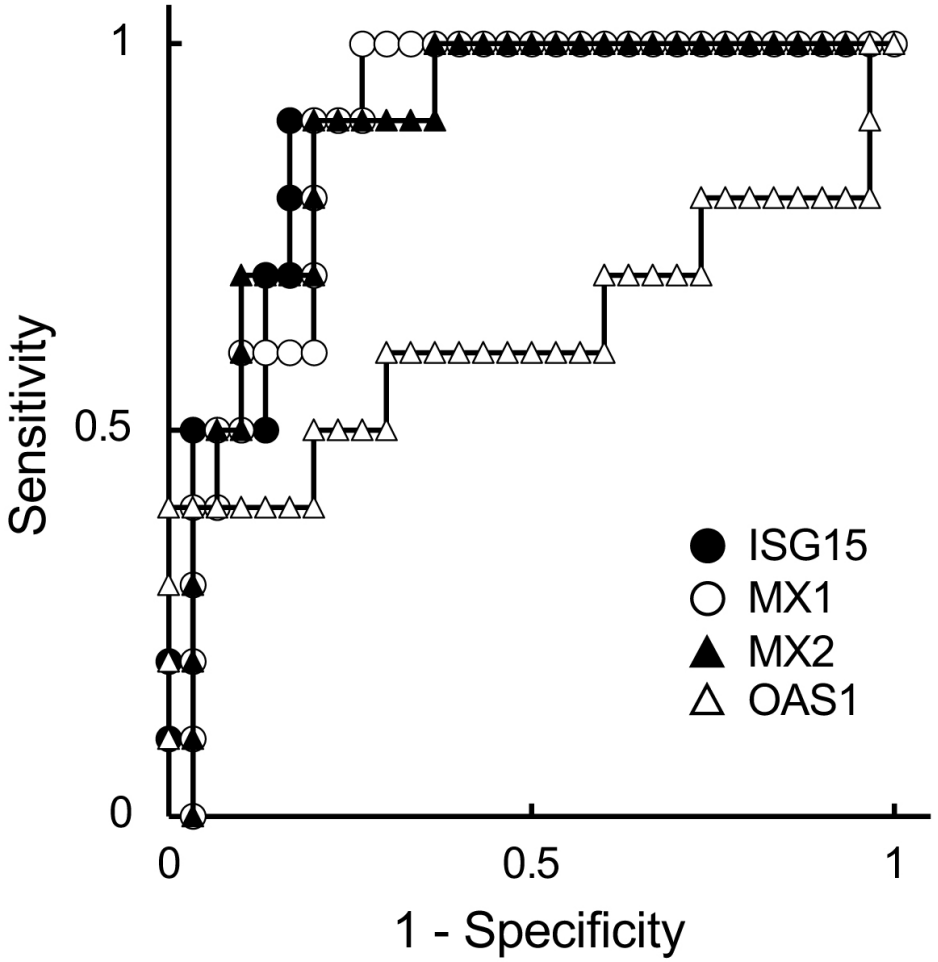
Nilai ditampilkan sebagai jumlah salinan gen/ *GAPDH* (rata-rata±SE). Perbedaan huruf menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok hamil, tidak hamil, dan tidak hamil dengan kematian embrio akhir berdasarkan uji Kruskal–Wallis yang dilanjutkan dengan uji Steel–Dwass ($P<0,05$). *ISG15*, gen 15 yang distimulasi interferon; *MX1* Dan *MX2*, Dinamin MX seperti GTPase 1 dan 2; *OAS1*, 2'-5' oligoadenilat sintetase 1; *GAPDH*, gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase.

Untuk menentukan penanda prediktif yang lebih sesuai untuk status embrio, khususnya pada sapi ET, tingkat ekspresi ISG di PBL diperkirakan dan dievaluasi menggunakan analisis kurva ROC (Gambar 1 dan Tabel 3).

Tabel 3. Nilai area di bawah kurva (AUC) dan batas indeks Youden diperkirakan menggunakan analisis karakteristik operasi penerima pada sapi JB yang ditransfer embrio pada hari ke 21 kebuntingan (14 hari setelah transfer embrio).

Nilai	*ISG15*	*MX1*	*MX2*	*OAS1*
AUC	0,903	0,883	0,883	0,623
Indeks Youden	0,386	0,174	0,380	0,986

Nilai AUC dianggap tinggi jika 0,9 < AUC < 1, sedang jika 0,7 < AUC < 0,9, rendah jika 0,5 < AUC < 0,7, dan nonprediktif jika AUC < 0,5 [36,37].



Gambar 1. Kurva Receiver Operating Characteristic (ROC) ekspresi ISG pada sapi JB yang ditransfer embrio pada hari ke 21 kebuntingan. Ekspresi dari*ISG15*(lingkaran tertutup),*MX1*(lingkaran terbuka),*MX2* (segitiga tertutup), dan*OAS1*(segitiga terbuka) dianalisis menggunakan kurva ROC. Sumbu horizontal dan vertikal masing-masing memiliki 1 spesifisitas dan sensitivitas. Oleh karena itu, pojok kiri atas merupakan titik ideal dengan sensitivitas dan spesifisitas 100%.

Kami menggunakan nilai kelompok tidak hamil dan tidak hamil dengan kematian embrio lanjut untuk analisis kurva ROC karena tingkat ISG tidak berbeda antara kelompok-kelompok ini (Tabel2). Kurva ROC menunjukkan seluruh level ISG, kecuali*OAS1*tingkat, secara tepat memprediksi status kehamilan pada hari ke 21 (Gambar1). Nilai AUC ISGs dikategorikan tinggi atau hampir tinggi (Tabel3).

3.2. Prediksi Status Gestasional Masa Peri-Implantasi pada Sapi ET

Status kehamilan selama periode peri-implantasi pada sapi ET diprediksi menggunakan nilai batas konvensional (AVE) untuk ISG, yang diperkirakan dari penelitian sebelumnya [26], dan nilai batas indeks Youden diperkirakan menggunakan analisis kurva ROC (Tabel3). Saat menerapkan nilai AVE ISG untuk memprediksi status kehamilan pada hari ke 21 kehamilan, sensitivitasnya relatif lebih tinggi (60,0–100%), namun nilai spesifisitas dan akurasi (10,0–66,6%) lebih rendah dibandingkan yang ditentukan menggunakan Youden. indeks (Tabel4). Untuk*ISG15*,*MX1*, Dan*MX2*, sensitivitas, spesifisitas, dan akurasi indeks Youden adalah 80% atau lebih tinggi. Masing-masing NPV menunjukkan nilai tinggi yang diperkirakan menggunakan metode indeks AVE dan Youden.

Tabel 4. Nilai prediksi pada hari ke 21 kebuntingan (14 hari setelah transfer embrio) diperkirakan menggunakan AVE dan indeks Youden pada sapi JB.

	Nilai Ambang = AVE				Nilai Ambang Batas = Indeks Youden			
	ISG15	***MX1***	***MX2***	***OAS1***	***ISG15***	***MX1***	***MX2***	***OAS1***
dll	10	10	10	6	8	9	9	4
FP	11	27	19	10	5	6	6	0
FN	0	0	0	4	2	1	1	6
TN	19	3	11	20	25	24	24	30
Kepekaan[A]	100	100	100	60.0	80.0	90.0	90.0	40.0
Kekhususan[B]	63.3	10.0	36.7	66.6	83.3	80.0	80.0	100
Ketepatan	72.5	32.5	52.5	65.0	82.5	82.5	82.5	85.0
PPV	47.6	27.0	34.5	37.5	61.5	60.0	60.0	100
NPV	100	100	100	83.3	93.6	96.0	96.0	83.3

AVE, nilai rata-rata; TP, jumlah sapi yang benar-benar positif; FP, jumlah sapi positif palsu; FN, jumlah sapi negatif palsu; TN, jumlah sapi benar-benar negatif; PPV, nilai prediksi positif; NPV, nilai prediksi negatif. Nilai rata-rata ISGs selama siklus estrus (Yoshino et al., 2020) dan indeks Youden digunakan sebagai nilai ambang batas. Setiap nilai diperkirakan menggunakan rumus yang disajikan pada Bagian Bahan dan Metode. Sensitivitas, spesifisitas, akurasi, PPV, dan NPV ditampilkan sebagai persentase.[A]Sensitivitas menunjukkan kemungkinan sapi yang benar-benar bunting terdiagnosis bunting.[B]Spesifisitas menunjukkan kemungkinan sapi tersebut didiagnosis tidak bunting.

4. Diskusi

Indikator prediksi kehamilan sangat penting secara praktis dan ekonomis untuk reproduksi sapi dalam negeri. Kami menetapkan keakuratan ekspresi ISG dalam PBL sebagai bukti prediktif pada sapi Holstein dan JB yang diinseminasi buatan [25,26] dan menerapkan metode ini pada sapi JB dalam penelitian ini. Pertama, ekspresi ISG dalam PBL diperiksa untuk menentukan kesesuaian penerapan praktis kadar ISG darah sebagai indikator prediksi kehamilan selama fase peri-implantasi. Sepuluh sapi bunting, dua puluh tiga sapi tidak bunting, dan tujuh sapi tidak bunting dengan kematian embrio lanjut digunakan untuk memprediksi status kehamilan sapi ET menggunakan nilai ISG. Tingkat kesuburan kawanan domba tersebut rendah tetapi memberikan model yang tepat untuk kehilangan dan/atau kematian embrio yang terlambat.

Pada hari ke 21 kehamilan, kadarnya *ISG15*, *MX1*, Dan *MX2* PBL jauh lebih tinggi pada kelompok hamil dibandingkan kelompok tidak hamil, serupa dengan yang dilaporkan oleh penelitian sebelumnya mengenai AI [25]. Oleh karena itu, keandalan nilai batas ISG dinilai pada sapi ET untuk memprediksi status kehamilan selama interval peri-implantasi. Indeks Youden telah digunakan untuk memperkirakan nilai batas untuk status fisiologis dan patologis yang berbeda menggunakan kurva ROC [29,30]. Penggunaan nilai batas AVE ISG yang dilaporkan sebelumnya [19] dan keandalan teknik ini dikonfirmasi menggunakan analisis ROC dan indeks Youden dalam penelitian ini, dan penerapan nilai batas AVE mengkonfirmasi kredibilitas metode tersebut. Dengan menggunakan AVE pada sapi ET JB pada hari ke 21 kebuntingan, sensitivitas dan NPV diamati tinggi, namun spesifisitas, akurasi, dan PPV rendah. Metode cutoff indeks Youden memiliki spesifisitas dan akurasi yang lebih tinggi dibandingkan estimasi AVE. AUC yang diperoleh dengan menggunakan analisis kurva ROC menunjukkan keakuratan prediksi tersebut dengan nilai AUC yang tinggi [36,37]. Nilai-nilai dari *ISG15*, *MX1*, Dan *MX2* pada hari ke 21 adalah sekitar 0,9 pada sapi ET dan hampir sama dengan penelitian sebelumnya pada sapi AI [26]. Pada penelitian sebelumnya, perbedaan level ISG secara spesifik *ISG15* Dan *MX2*, antara sapi bunting dan sapi tidak bunting menunjukkan bahwa keduanya dapat menjadi indikator utama untuk memprediksi status kebuntingan pada sapi Holstein dan JB yang diinseminasi buatan [25,26]. Namun, *MX1* bukan merupakan indikator yang cocok ketika menerapkan nilai batas AVE untuk prediksi karena spesifisitas, presisi, dan PPV yang rendah. Namun, dengan menerapkan indeks Youden pada nilai batas, *MX1* juga dapat digunakan sebagai indikator yang tepat, setara dengan *ISG15* Dan *MX2*. Karena itu, *ISG15*, *MX1*, Dan *MX2* mungkin merupakan indikator kebuntingan yang cocok pada sapi ET.

Menariknya, kadar ISG darah serupa diamati pada kelompok kematian embrio tidak hamil dan akhir hamil penelitian ini. Hasil ini menunjukkan bahwa sederhana [illegible]

apakah ekspresi gen berbeda antara sapi bunting dan tidak bunting dengan kematian embrio lanjut pada hari ke 21 kebuntingan? Pertanyaan ini muncul karena kedua kelompok sudah mempunyai konsepsi sekitar hari ke 21. Tingkat ISG mungkin mencerminkan perubahan morfologi embrio selama proses implantasi [38,39]. Kadar ISG pada kelompok tidak bunting dan kelompok kematian embrio akhir serupa pada sapi ET pada hari ke 21, yang mungkin mengindikasikan status perkembangan embrio. Embrio pada usia kehamilan sekitar 17-19 hari secara signifikan mengubah bentuk dan aktivitasnya, dan selaput janin yang melebar menutupi seluruh permukaan endometrium selama periode kritis implantasi [3,38,40]. Perbedaan tingkat ISG antara kelompok kematian embrio akhir yang hamil dan tidak hamil menunjukkan kurangnya sekresi IFNT oleh embrio pada kelompok kematian embrio akhir.

Dalam reproduksi sapi dalam negeri, tingkat kesuburan yang sebenarnya sangat penting bagi peternak yang mengharapkan sapinya bunting sesegera mungkin setelah melahirkan. Meskipun berbagai teknologi dan strategi baru, seperti superovulasi, fertilisasi in vitro, dan transfer embrio, telah diterapkan untuk meningkatkan produksi seumur hidup di industri peternakan selama beberapa dekade terakhir, kehilangan atau kematian embrio setelah pembuahan masih menjadi masalah besar, terutama pada usia 3 tahun. -4 minggu [19]. Teknik baru dan mutakhir, seperti transfer embrio, akan membantu meningkatkan kesuburan tidak hanya pada sapi tetapi juga spesies mamalia lainnya, termasuk manusia, dan keberhasilan pengelolaannya harus dipertimbangkan. Hasil penelitian saat ini menunjukkan bahwa konsepsi diamati menggunakan ultrasonografi sekitar 30 hari pada kelompok kehamilan dan kematian embrio akhir. Namun kadar ISG kelompok kematian embrio akhir pada hari ke-21 lebih rendah dibandingkan kelompok hamil. Penting untuk menentukan apakah embrio sudah mati, hidup, atau berkembang dengan baik. Artinya diperlukan beberapa indikator untuk mengetahui kondisi embrio. Kami berharap metode deteksi ISG di PBL akan berguna dalam memecahkan permasalahan yang menantang. Berbeda dengan prediksi positif, prediksi negatif status kehamilan pada transfer embrio dapat diandalkan dan ISG dapat dideteksi pada PBL 14 hari setelah transfer embrio. Penerapan ekspresi ISG pada PBL selama periode peri-implantasi akan memberikan informasi yang akurat dalam keadaan ini. Namun, ukuran sampel dalam penelitian ini kecil dan tidak ada data pada hari-hari berbeda pada periode peri-implantasi, kecuali hari ke-21 pada sapi ET, yang cukup untuk memprediksi kehamilan. Penelitian lebih lanjut dengan menggunakan lebih banyak hewan di sekitar peri-implantasi diperlukan untuk mengkonfirmasi keandalan teori mengenai ekspresi gen yang tinggi pada sapi ET.

Ada beberapa metode praktis untuk mengevaluasi status kehamilan selama awal kehamilan, termasuk pengukuran serum progesteron dan protein B terkait kehamilan, serta palpasi transrektal. Namun prediksi status kehamilan pada sapi ET masih sulit dilakukan pada masa implantasi [14,41,42]. Ekspresi gen spesifik pada PBL mungkin merupakan metode prediksi yang dapat diandalkan untuk menentukan status kehamilan. Meskipun prosedur ini dapat diandalkan karena metode prediksi ISG telah ditetapkan dan digunakan pada sapi dan ruminansia lainnya, kami tidak memiliki informasi yang cukup untuk mengidentifikasi PBL yang merespons terhadap*ISG15*,*MX1*,*MX2*, dan/atau*OAS1*[22]. Hubungan antara pola ekspresi gen pada PBL dan indikator kondisi fisiologis yang berbeda sudah jelas.24,25,43,44]. Penelitian lebih lanjut mengenai spesifisitas masing-masing gen diperlukan untuk memahami respons yang tepat terhadap molekul ISG tertentu dan peran rinci ISG dalam pengembangan embrio tahap awal.

5. Kesimpulan

ISG klasik, khususnya*ISG15*,*MX1*, Dan*MX2*, merupakan biomarker yang sangat baik untuk memprediksi status tidak bunting selama periode peri-implantasi pada sapi ET JB. Biomarker ini mungkin dapat diandalkan untuk memprediksi kehamilan secara negatif selama transfer embrio, namun kurang dapat diandalkan untuk membuat prediksi positif. Selain itu, ekspresi ISG dalam PBL memberikan informasi kehamilan dini selama pengenalan kehamilan, apapun metode konsepsi pada sapi.

Kontribusi Penulis: Konseptualisasi, HY, KK dan KH; metodologi, HY, KK dan KH; analisis formal, KK; investigasi, HY dan KK; sumber daya, T.-iH, KI (Kosuke Iga), HM, TY, YH, KI (Kei Imai), TI-O. dan TT; kurasi data, HY, KK dan KH; penulisan—persiapan draf asli,
HY, KK dan KH; penulisan—review dan editing, HY, TK, KK dan KH; visualisasi, KK; pengawasan, KK dan KH; administrasi proyek, KK dan KH; perolehan dana, KH Semua penulis telah membaca dan menyetujui versi naskah yang diterbitkan.

Pendanaan: Penelitian ini didanai oleh Research Program on Innovative Technologies for Animal Breeding, Reproduction, and Vaccine Development dari KEMENTERIAN PERTANIAN, KEHUTANAN, DAN PERIKANAN Jepang, nomor hibah REP-1003.

Pernyataan Dewan Peninjau Kelembagaan: Protokol penelitian pada hewan telah disetujui oleh Institutional Review Board dari IWATE UNIVERSITY (nomor persetujuan: A201244, A201434, dan A201701)" untuk penelitian yang melibatkan hewan.

Pernyataan Persetujuan yang Diinformasikan: Tak dapat diterapkan.

Pernyataan Ketersediaan Data: Kumpulan data yang digunakan dan/atau dianalisis selama penelitian ini tersedia dari penulis terkait berdasarkan permintaan yang masuk akal.

Ucapan Terima Kasih: Kami berterima kasih kepada Fumiyo Taguchi dan Mariko Sato karena mengekstraksi RNA dari darah sapi.

Konflik kepentingan: Para penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

Referensi

1. Martal, J.; Babêtidak, N.; Kamuflase, S.; Huynh, L.; Lantier, F.; Hermier, P.; L'Haridon, R.; Charpigny, G.; Charlier, M.; Chaouat, G. Perkembangan terkini dan potensi untuk mengurangi kematian embrio pada ruminansia: Peran IFN-τ dan sitokin lainnya pada awal kehamilan.*mereproduksi. Subur. Dev.***1997**,*9*, 355–380. [Referensi Silang] [PubMed]
2. Roberts, RM Conceptus inferteon dan pengakuan ibu atas kehamilan.*biologi. mereproduksi.***1989**,*40*, 449–452. [Referensi Silang] [PubMed]
3.Hansen, TR; Sinedino, LDP; Spencer, TE Tindakan parakrin dan endokrin interferon tau (IFNT).*Reproduksi***2017**,*154*, F45–F59. [Referensi Silang] [PubMed]
4. Shirasuna, K.; Matsumoto, H.; Matsuyama, S.; Kimura, K.; Bollwein, H.; Miyamoto, A. Kemungkinan peran interferon tau pada korpus luteum sapi dan neutrofil selama awal kehamilan.*Reproduksi***2015**,*150*, 217–225. [Referensi Silang] [PubMed]
5. Wijma, R.; Stangaferro, ML; Kamat, MM; Vasudevan, S.; Ott, TL; Giordano, JO Kematian embrio pada masa pemeliharaan korpus luteum menyebabkan perubahan fungsi ovarium pada sapi perah laktasi.*biologi. mereproduksi.***2016**,*95*, 112.[Referensi Silang]
6. Ruhmann, B.; Giller, K.; Hankele, AK; Ulbrich, SE; Schmicke, M. Interferon-τ menginduksi ekspresi gen pada hepatosit sapi selama awal kehamilan.*Teriogenologi***2017**,*104*, 198–204. [Referensi Silang]
7. Alhussien, MN; Kamboj, A.; Aljader, MA; Panda, BSK; Yadav, ML; Sharma, L.; Muhammad, S.; Syekh, AA; Lotfan, M.; Kapila, R.; dkk. Pengaruh stres termal tropis terhadap respon imun peri-implantasi pada sapi.*Teriogenologi***2018**,*114*, 149–158. [Referensi Silang]
8. Ford, N.; Bazer, FW; Spencer, TE; Lonergan, P. 'Konseptualisasi' endometrium: Identifikasi protein turunan konseptus selama awal kehamilan pada sapi1.*biologi. mereproduksi.***2015**,*92*, 156.[Referensi Silang]
9. Bazer, FW; Thatcher, WW Mencatat penemuan interferon tau.*Reproduksi***2017**,*154*, F11–F20. [Referensi Silang]
10. Au-Yeung, N.; Horvath, CM Regulasi transkripsi dan kromatin dalam interferon dan ekspresi gen antivirus bawaan. *Faktor Pertumbuhan Sitokin Rev.***2018**,*44*, 11–17. [Referensi Silang]
11. Williams, BRG; Williams, BRG Regulasi transkripsi gen yang distimulasi interferon.*euro. J. Biokimia.***1991**,*200*, 1–11. [Referensi Silang] [PubMed]
12. Schoggins, JW Gen yang distimulasi interferon: Apa fungsinya?*Ann. Pendeta Virol.***2019**,*6*, 567–584. [Referensi Silang]
13.Fricke, PM; Ricci, A.; Giordano, JO; Carvalho, PD Metode dan implementasi diagnosis kebuntingan pada sapi perah.*Dokter hewan. Klinik. Anim Makanan-Am Utara. Praktek.***2016**,*32*, 165–180. [Referensi Silang] [PubMed]
14. Stevenson, JS; Britt, JH Tinjauan 100 tahun: Manajemen reproduksi wanita yang praktis.*J. Ilmu Susu.***2017**,*100*, 10292–10313. [Referensi Silang] [PubMed]
15. Ott, TL Ulasan simposium: Deteksi imunologis konseptus sapi selama awal kehamilan.*J. Ilmu Susu.***2019**,*102*, 3766–3777. [Referensi Silang] [PubMed]
16. Senger, PL Masalah deteksi estrus: Konsep, teknologi, dan kemungkinan baru.*J. Ilmu Susu.***1994**,*77*, 2745–2753. [Referensi Silang]
17. Quintela, LA; Barrio, M.; Pena, AI; Becerra, JJ; Cainzos, J.; HerradHain, PG; DSayaaz, C. Penggunaan USG dalam manajemen reproduksi sapi perah.*mereproduksi. Domestik. animasi.***2012**,*47*, 34–44. [Referensi Silang]
18. Filho, RVO; Perancis, GA; Reese, ST; Dantas, FG; Font, PLP; Masak, RF; Rhinehart, JD; Thompson, KW; Pohler, KG Menggunakan glikoprotein terkait kebuntingan (PAG) untuk deteksi kebuntingan pada hari ke 24 kebuntingan pada sapi potong.*Teriogenologi***2020**, *141*, 128–133. [Referensi Silang]

19. Hansen, PJ Janji transfer embrio pada sapi yang belum terpenuhi—Mengapa angka kebuntingan tidak lebih besar dan apa yang bisa kita lakukan untuk mengatasinya?*J.Anim. Sains.***2020**,*98*, skaa288. [Referensi Silang]
20. Gifford, C.; Racicot, K.; Clark, DS; Austin, KJ; Hansen, TR; Lucy, MC; Davies, CJ; Ott, TL Regulasi gen yang distimulasi interferon pada leukosit darah tepi pada sapi perah bunting dan dibesarkan, tidak hamil.*J. Ilmu Susu.***2007**,*90*, 274–280. [Referensi Silang]
21. Hijau, JC; Okamura, CS; Poock, SE; Lucy, MC Pengukuran interferon-tau (IFN-τ) merangsang ekspresi gen dalam leukosit darah untuk diagnosis kehamilan dalam waktu 18-20 hari setelah inseminasi pada sapi perah.*animasi. mereproduksi. Sains.***2010**,*121*, 24–33. [Referensi Silang] [PubMed]
22. Kizaki, K.; Shichijo-Kizaki, A.; Furusawa, T.; Takahashi, T.; Hosoe, M.; Hashizume, K. Ekspresi gen neutrofil diferensial pada awal kehamilan sapi.*mereproduksi. biologi. Endokrinol.***2013**,*11*, 6.[Referensi Silang] [PubMed]
23. Stevenson, JL; Dalton, JC; Ott, TL; Racicot, KE; Chebel, RC Korelasi antara status reproduksi dan kadar asam ribonukleat pembawa pesan stabil dari gen resistensi myxovirus, MX2, pada leukosit darah tepi sapi perah.*J.Anim. Sains.***2007**,*85*, 2163–2172. [Referensi Silang] [PubMed]
24. Toji, N.; Shigeno, S.; Kizaki, K.; Koshi, K.; Matsuda, H.; Hashiyada, Y.; Imai, K.; Takahashi, T.; Ishiguro-Oonuma, T.; hasizume, K. Evaluasi gen yang distimulasi interferon dalam granulosit darah tepi sebagai respon sensitif terhadap sinyal konseptus awal sapi.*Dokter hewan. J.***2017**,*229*, 37–44. [Referensi Silang]
25. Yoshino, H.; Toji, N.; Sasaki, K.; Koshi, K.; Yamagishi, N.; Takahashi, T.; Ishiguro-Oonuma, T.; Matsuda, H.; Yamanouchi, T.; Hashiyada, Y.; dkk. Nilai ambang batas prediktif untuk diagnosis kebuntingan dini pada sapi menggunakan gen yang distimulasi interferon pada granulosit.*Teriogenologi***2018**,*107*, 188–193. [Referensi Silang]
26. Yoshino, H.; Kizaki, K.; Iga, K.; Hirata, T.; Matsuda, H.; Yamanouchi, T.; Hashiyada, Y.; Toji, N.; Ishiguro-Oonuma, T.; Takahashi, T.; dkk. Penggunaan metode prediksi status kebuntingan dini dengan menggunakan analisis kurva karakteristik operasi penerima gen yang distimulasi interferon leukosit darah tepi pada sapi hitam Jepang.*animasi. mereproduksi. Sains.***2020**,*214*, 106283.[Referensi Silang]
27. Hasler, JF Empat puluh tahun transfer embrio pada sapi: Sebuah tinjauan yang berfokus pada jurnal Theriogenology, pertumbuhan industri di Amerika Utara, dan kenangan pribadi.*Teriogenologi***2014**,*81*, 152–169. [Referensi Silang]
28. Hashiyada, Y.; Okada, M.; Imai, K. Transisi tingkat kebuntingan embrio sapi yang dibelah dua setelah transfer bersama dengan vesikel trofoblas yang dibuat dari embrio yang dibuahi in vitro yang dikultur secara in vivo.*J.Reproduksi. Dev.***2005**,*51*, 749–756. [Referensi Silang]
29. Geary, TW; Terbakar, GW; Moraes, JGN; Lumut, JI; Denikol, AC; Dobbs, KB; Ortega, MS; Hansen, PJ; Wehrman, AKU; Neibergs, H.; dkk. Identifikasi sapi dara dengan kapasitas uterus unggul untuk kebuntingan.*biologi. mereproduksi.***2016**,*95*, 47.[Referensi Silang]
30. Ealy, M; Wooldridge, LK; McCoski, Dewan SR mengundang tinjauan: Konsekuensi pasca transfer dari embrio yang diproduksi secara in vitro pada sapi. *J.Anim. Sains.***2019**,*97*, 2555–2568. [Referensi Silang]
31. Matsuyama, S.; Kojima, T.; Kato, S.; Kimura, K. Hubungan antara kuantitas IFNT yang diperkirakan dengan ekspresi gen yang distimulasi IFN dalam sel mononuklear darah tepi dan kematian embrio sapi setelah AI atau ET.*mereproduksi. biologi. Endokrinol.***2012**, *10*, 21.[Referensi Silang] [PubMed]
32. Hirayama, H.; Moriyasu, S.; Kageyama, S.; Sawai, K.; Takahashi, H.; Geshi, M.; Fujii, T.; Koyama, T.; Koyama, K.; Miyamoto, A.; dkk. Peningkatan pengakuan ibu terhadap kehamilan dengan embrio partenogenetik dalam transfer embrio sapi.*Teriogenologi* **2014**,*81*, 1108–1115. [Referensi Silang]
33. Hiraizumi, S.; Nishinomiya, H.; Oikawa, T.; Sakagami, N.; Sano, F.; Nishino, O.; Kurahara, T.; Nishimoto, N.; Ishiyama, O.; Hasegawa, Y.; dkk. Respon superovulasi pada sapi Hitam Jepang yang menerima satu pengobatan hormon perangsang folikel babi subkutan atau enam perawatan intramuskular selama tiga hari.*Teriogenologi***2015**,*83*, 466–473. [Referensi Silang]
34. Sugimura, S.; Akai, T.; Somfai, T.; Hirayama, M.; Aikawa, Y.; Oh ambil, M.; Hattori, H.; Kobayashi, S.; Hashiyada, Y.; Konishi, K.; dkk. Sistem kultur microwell berbasis polistiren yang kompatibel dengan sinematografi selang waktu: Alat baru untuk melacak perkembangan embrio sapi individu.*biologi. mereproduksi.***2010**,*83*, 970–978. [Referensi Silang] [PubMed]
35. Bustin, S.; Benes, V.; Garson, J.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, MW; Shipley, GL; dkk. Pedoman MIQE: Informasi minimum untuk publikasi eksperimen PCR kuantitatif waktu nyata.*Klinik. kimia.***2009**,*55*, 611–622. [Referensi Silang] [PubMed]
36. Hanley, JA; McNeil, BJ Arti dan penggunaan area di bawah kurva karakteristik operasi penerima (ROC).*Radiologi***1982**, *143*, 29–36. [Referensi Silang] [PubMed]
37. Schisterman, EF; Perkins, NJ; Liu, A.; Bondell, H. Optimal Cut-point dan Indeks Youden yang sesuai untuk mendiskriminasi individu menggunakan sampel darah yang dikumpulkan.*Epidemiologi***2005**,*16*, 73–81. [Referensi Silang]
38. Brooks, K.; Terbakar, G.; Spencer, TE Pemanjangan konsep pada ruminansia: Peran progesteron, prostaglandin, interferon tau dan kortisol. *J.Anim. Sains. Bioteknologi.***2014**,*5*, 53.[Referensi Silang]
39. Romero, JJ; Antoniazzi, AQ; Bersih, TM; Ashley, RL; Webb, BT; Smirnova, NP; Bot, RC; Bruemmer, JE; Bazer, FW; Anthony, RV; dkk. Pelepasan Temporal, tindakan parakrin dan endokrin interferon-tau yang diturunkan dari konsep ovine selama awal kehamilan. *biologi. mereproduksi.***2015**,*93*, 146.[Referensi Silang]
40. Spencer, TE; Ford, N.; Lonergan, P. Peran progesteron dan faktor turunan konseptus dalam biologi uterus selama awal kehamilan pada ruminansia.*J. Ilmu Susu.***2016**,*99*, 5941–5950. [Referensi Silang]
41. Balhara, AK; Gupta, M.; Singh, S.; Mohanty, AK; Singh, I. Diagnosis kehamilan dini pada sapi: Status saat ini dan arah masa depan.*Sains. Dunia J.***2013**,*2013*, 958540.[Referensi Silang] [PubMed]

42. Reese, ST; Pereira, MC; Vasconcelos, JLM; Smith, MF; Hijau, JA; Geary, TW; Peres, RFG; Perry, GA; Pohler, KG Penanda kebuntingan: Seberapa dini kita dapat mendeteksi kebuntingan pada sapi dengan menggunakan glikoprotein terkait kebuntingan (PAGs) dan mikroRNA? *animasi. mereproduksi.***2016**, *13*, 200–208. [Referensi Silang]
43. Sasaki, K.; Yamagishi, N.; Kizaki, K.; Devkota, B.; Hashizume, K. Profil ekspresi gen berbasis mikroarray sel mononuklear darah tepi pada sapi perah dengan hipokalsemia eksperimental dan demam susu.*J. Ilmu Susu.***2014**,*97*, 247–258. [Referensi Silang] [PubMed]

44. Kizaki, K.; Kageyama, T.; Toji, N.; Koshi, K.; Sasaki, K.; Yamagishi, N.; Ishiguro-Oonuma, T.; Takahashi, T.; Hashizume, K. Profil ekspresi gen pada granulosit sapi mencerminkan penyimpangan fungsi hati.*animasi. Sains. J.***2020**,*91*, e13324. [Referensi Silang]

Penafian/Catatan Penerbit: Pernyataan, pendapat dan data yang terkandung dalam semua publikasi adalah sepenuhnya milik masing-masing penulis dan kontributor dan bukan milik MDPI dan/atau editor. MDPI dan/atau editor melepaskan tanggung jawab atas kerugian apa pun pada orang atau properti akibat ide, metode, instruksi, atau produk apa pun yang dirujuk dalam konten.

JURNAL ASLI (DOKUMEN SUMBER)

Improving Animal Production Biosecurity to Minimise Global One Health Risks

Despite remarkable advances in human and veterinary medicine over the past century, infectious diseases remain an important cause of morbidity and mortality for both humans and animals around the world[1–4]. At least 60% of existing human infectious diseases and up to 75% of newly emerging diseases in humans are thought to have an animal origin, underscoring that the health of animals and humans are irrevocably intertwined[5].

An estimate of the combined human and animal burdens of specific zoonotic diseases can be calculated to provide tangible evidence of the significant impact of a particular zoonotic disease on a given society[6,7]. For example, the World Health Organization (WHO) has estimated the annual global cost of cysticercosis, a parasitic infection transmitted through consumption of infected pork, to exceed $760,000 USD in terms of human health considerations and over $2 billion USD in terms of economic losses in livestock production[8]. Risks associated with spread of infectious diseases from animals are likely only to increase with increasing globalisation and transboundary movement of animals and animal products. The practice of routinely taking into account the health outcomes of humans and animals (and the environment), known as One Health (Figure 1), is essential for continued improvements in animal and human medicine for the future.

Figure 1: The 'One Health' umbrella, which recognises the intertwined fates of humans, animals, and the environment (from[9]).

There are many areas of consideration for minimising global One Health risks, such as prudent antimicrobial use, competent food inspection authorities, and the use of vaccines to reduce and eliminate key infections. Another significant area of attention is enhancement of biosecurity employed in animal production. In addition to improving animal health and welfare, improved biosecurity practices lead to an increased human health index, because of increased farm stability, better profitability of marketed goods and livestock, and improved food safety, and thus human health. Well defined animal biosecurity programmes are part of sustainable agricultural practices.[10] Because of its direct impact on human health outcomes, enhancing biosecurity for food animal production directly targets at least six of the UN's 17 sustainable development goals (https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/).

Biosecurity – A Definition

In this context, biosecurity refers to the integrated practices and policies applied at a national, regional or local level to minimise and manage the various threats that may contribute to illness or unthriftiness in animals being raised for food or fibre. Biosecurity generally refers to keeping infectious agents out of an animal operation or farm, whereas biocontainment refers to keeping any infectious agent(s) present on a farm or within a region contained to that region.

A better understanding of basic biosecurity principles by farmers and more consistent application of them can significantly reduce the burden of zoonotic disease and pre-empt animal disease outbreaks in a given region or country. Recent epidemiologic modelling of known patterns of pathogen transmission across pig farms in countries with defined biosecurity practices have demonstrated that production efficiency and animal welfare could be improved with more consistent attention to enhanced biosecurity practices[11]. Further, biosecurity principles may be combined with vaccination or preventative therapeutic administration to reduce or eradicate diseases in a region, such as cysticercosis in swine[6]. An effective regional biosecurity programme therefore requires training of producers and dissemination of educational resources as well as respectful local support and oversite networks to be sustainable[12]. In extensive settings, assistance to farmers often can be effectively accomplished through grassroots or peer-to-peer organisations.

Basic Principles of Biosecurity in Animal Production and Management

Implementation of an effective on-farm or livestock management biosecurity programme does not have to be an expensive or complicated undertaking. Several key principles have been shown to be highly effective for promoting biosecurity, regardless of the species being considered, and these are discussed in more detail below[10]. These principles relate to access management, animal management, and operational management. Even in remote and extensive farming situations, basic biosecurity principles can be practised.

Controlled access to animals, through the use of pens, sheds, barns, and other shelters can minimise intra- and interspecies exposure to animals and transmission of pathogens. Routinely practising good hygiene, such as regular handwashing (particularly before eating or preparing human food), cleaning clothing and footwear heavily soiled with animal waste, and removing or burying human faeces to prevent animals, such as pigs, from contacting or consuming them is important for reducing bioburden and breaking parasitic transmission cycles between animals and humans. Exclusion of pests and vermin is important to reduce disease transmission by

arthropod and rodent vectors, and because insects and vermin can infest animal feeds, such as grain, and reduce feed quality. Physical separation of sick and healthy animals, and handling and attending to the needs of healthy animals first will help to reduce disease transmission within a group of animals. These practices also apply when introducing new animals into a herd or flock. A period of quarantine and stabilisation can be helpful to ensure that new stock are healthy and free from disease. Ensuring that animal feed is unspoiled and that water is clean and uncontaminated will help to minimise the spread of disease within a group of animals. Timely and appropriate disposal of deadstock is important as poorly managed disposal of carcasses can lead to persistence of pathogens in the environment and can also attract pests. Similarly, animal wastes and manure need to be appropriately managed to reduce pathogen burden. More sophisticated programmes can incorporate written plans, self-assessment schemes and ongoing monitoring.

Numerous examples of species-specific biosecurity guidelines are available to assist farmers with understanding these practices and developing robust programmes.

Biosecurity Risk Management

Despite the apparent sensibility of adopting better biosecurity practices there can be resistance to changing traditional management and husbandry practices as well as daily habits and routines. This has led to spectacular outbreaks of disease in animals and humans, such as multiple outbreaks of virulent and unusual forms of avian influenza in China when pigs, poultry and other animal species are mixed in public markets[4]. Even in economically well developed countries with regulated production oversight systems and national production standards, producers may fail to see the value of implementing robust biosecurity practices, leading to increased risks to both human and animal health[13-15].

Traditionally, the responsibility for biosecurity risk management, assessment, and communication has fallen largely on the shoulders of farmers, their veterinarians, and their associated marketing groups and these programmes have been managed for better or for worse within any given country. This has resulted in inconsistent implementation of recommended practices and gaps in programmes often aren't identified until health problems have occurred, for example, transmission of *Salmonella enteriditis* in farmed eggs[16]. Because all people have a vested interest in their own health as well as in the health and welfare of animals raised around them and because animals and animal byproducts are often shipped from the origin to distant places around the world it is critical that an integrated approach be taken for farmed animal biosecurity risk management. This builds on strengths that may already exist in local or regional oversight.

Health Security Interface – An Integrated Approach

The global interdependence of countries for food emphasises the need for better coordination and management of food animal biosecurity at national and international levels. The OIE (http://www.oie.int/for-the-media/press-releases/detail/article/investing-in-biosecurity-a-key-step-to-curb-the-spread-of-animal-diseases/), FAO (http://www.fao.org/biosecurity/) and WHO (http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/en/) all strongly espouse the need for better integrated approaches to biosecurity management to protect human and animal health. With a One Health approach for biosecurity risk management, there can be better accounting and reporting of biosecurity risks at regional and national levels with assistance and support provided, as needed, at international levels. Additional benefits of an integrated approach to biosecurity risk management include improved monitoring for human health concerns, better information-sharing nationally when biosecurity concerns arise, minimising trade disruptions related to biosecurity risks, addressing consumer concerns about animal biosecurity and One Health issues, and providing a better perspective from which to observe, monitor and act on transboundary diseases in animals.[10]

Conclusions

It is no longer possible for countries to consider the health and care of their food animals as an isolated and private affair. Increasing recognition of shared diseases between animals and humans together with a better understanding of foodborne pathogens and knowledge about complex global food distribution systems have only served to emphasise gaps in food animal biosecurity risk management around the world. To address these gaps and to ensure safer and more secure food for populations around the world, there is a need for governments to adopt a consistent, proactive and integrated approach to farm animal biosecurity risk management. Adoption of this approach should result in better biosecurity risk assessment, analysis, and preventative action to improve the lives of animals, humans, and their ecosystems.

REFERENCES

1. Anderson BD, Ma MJ, Wang GL, Bi ZQ, Lu B, Wang XJ, Wang CX, Chen SH, Qian YH, Song SX, Li M, Zhao T, Wu MN, Borkenhagen LK, Cao WC, Gray GC. Prospective surveillance for influenza. virus in Chinese swine farms. Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):87. doi: 10.1038/s41426-018-0086-1.
2. Khaing TA, Bawm S, Wai SS, Htut Y, Htun LL. Epidemiological survey on porcine cysticercosis in Nay Pyi Taw Area, Myanmar. J Vet Med. 2015:340828. doi: 10.1155/2015/340828.
3. Steinmuller N, Demma L, Bender JB, Eidson M, Angulo FJ. Outbreaks of enteric disease associated with animal contact: not just a foodborne problem anymore. Clin Infect Dis. 2006;43(12):1596-602.
4. Su S, Bi Y, Wong G, Gray GC, Gao GF, Li S. Epidemiology, evolution and recent outbreaks of avian influenza virus in China. J Virol. 2015; 89:8671-6.
5. Vorou RM, Papavassiliou VG, Tsiodras S. Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. Epidemiol Infect. 2007;135(8):1231-47.
6. Maurice J. Of pigs and people – WHO prepares to battle cysticercosis. Lancet. 2014; 384:571-2.
7. Torgerson PR, Rüegg S, Devleesschauwer B, Abela-Ridder B, Havelaar AH, Shaw APM, Rushton J, Speybroeck N. zDALY: An adjusted indicator to estimate the burden of zoonotic diseases. One Health. 2017;5:40-5. doi: 10.1016/j.onehlt.2017.11.003.
8. WHO. Some figures on neglected diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/zoonoses_figures/en/ (last accessed Nov 11, 2018).
9. Gibbs EPJ. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. Vet Rec. 2014; 174:85–91.
10. FAO. Part 1: Biosecurity principles and components. http://www.fao.org/docrep/pdf/010/a1140e/a1140e01.pdf (last accessed Nov 12, 2008).
11. Filippitzi ME, Brinch Kruse A, Postma M, Sarrazin S, Maes D, Alban L, Nielsen LR, Dewulf J. Review of transmission routes of 24 infectious diseases preventable by biosecurity measures and comparison of the implementation of these measures in pig herds in six European countries. Transbound Emerg Dis. 2018;65(2):381-398. doi: 10.1111/tbed.12758.
12. Rezaei A. Food safety: The farmer first health paradigm. One Health. 2018;5:69-73. doi: 10.1016/j.onehlt.2018.04.001.
13. Kylie J, Brash M, Whiteman A, Tapscott B, Slavic D, Weese

JS, Turner PV. Biosecurity practices and causes of enteritis on Ontario meat rabbit farms. Can Vet J. 2017, 58(6):571-8.

14. Compo N, Pearl DL, Tapscott B, Storer A, Hammermueller J, Brash M, Turner PV. On-farm biosecurity practices and causes of preweaning mortality in Canadian commercial mink kits. Acta Vet Scand. 2017; 59(1):57. doi: 10.1186/s13028-017-0326-8.
15. Graham JP, Leibler JH, Price LB, Otte JM, Pfeiffer DU, Tiensin T, Silbergeld EK. The animal-human interface and infectious disease in industrial food animal production: rethinking biosecurity and biocontainment. Public Health Rep. 2008; 123(3):282-99.
16. Trampel DW, Holder TG, Gast RK. Integrated farm management to prevent Salmonella Enteriditis contamination of eggs. J Appl Poultr Res. 2014; 23:353-65.

Patricia V. Turner,

Patricia V. Turner, MS, DVM, DVSc, DACLAM, DABT, DECAWBM (AWSEL) is President-Elect of the World Veterinary Association and Chair of the WVA's Animal Welfare Working Group and Veterinary Education Working Group. She lives in Canada and works in a global capacity overseeing animal welfare policy and risk management for Charles River.

Email: patricia.turner@crl.com

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

OPEN ACCESS Journal of Animal Health and Production

Research Article

Virulence Genes and Immunological Biomarkers for Brucellosis in Sheep & Goat

Asmaa A. Darwish*, Adel M. El-Kattan, Mona A. Mahmoud, Mohamed T. Ragab, Amani A. Hafez

Animal and Poultry Health Department, Animal and Poultry Division, Desert Research Center, Cairo, Egypt.

Abstract | *Brucella melitensis* is an annoying problem for animal breeders. It attacks different farm animals causing infertility, abortion, and stillbirth. This study aimed to figure out the common genes related to *B. melitensis* field strains virulence and assess the immunological, hormonal, and iron profile alterations related to *B. melitensis* infection in sheep and goat with special reference to their value as biomarkers for the disease. Vaginal swabs were collected from 110 ewes and 150 does for bacteriological examination. Blood samples were collected for immunological, hormonal, and iron profile estimation. The total recovery of *B. melitensis* was 13.50% with nearly equal percentages in sheep (13.60%), and goat (13.33%). *B. melitensis* isolates had *bvfA* gene, *virB* gene, and *ure* gene with percentages of 62.8%, 77%, and 37% respectively. *B. melitensis* infection in sheep and goat resulted in a significant (P<0.05) increase in the pro-inflammatory cytokines, acute phase proteins (APPs), free radicals, cortisol, growth hormone, and TSH concentrations and a significant (P<0.05) decline in the anti-inflammatory cytokine, anti-oxidants, insulin, T3, and T4 levels. The iron profile of infected animals was characterized by a significant (P<0.05) hypoferremia, hyperferritinemia, and hypotransferrinemia. The estimated pro-inflammatory cytokines and APPs yielded high sensitivity and specificity values in both infected species, but IL-1β, IL-6, and Fb had the highest likelihood ratios in infected sheep and IL-1β and IL-1α had the highest likelihood ratios in infected goat while Hp and IL-1β scored the highest percentages of increase among these markers. We concluded that *bvfA, virB,* and *ure* are the main virulence genes in *B. melitensis* isolates obtained from vaginal swabs of infected sheep and goat. *B. melitensis* infection elicits a prominent innate immune response in sheep and goat, resulting in several hormonal and iron profile alterations. IL-1β, IL-6, Fb, and Hp are good markers for sheep brucellosis, and IL-1β, IL-1α, and Hp are good indicators for goat brucellosis.

Keywords | *Brucella melitensis*; Virulence genes; Immunological changes; Hormonal changes; Iron profile.

Received | March 03, 2023; **Accepted** | April 05, 2023; **Published** | May 01, 2023
***Correspondence** | Asmaa A Darwish, Animal and Poultry Health Department, Animal and Poultry Division, Desert Research Center, Cairo, Egypt; **Email:** asmaa_vet25@yahoo.com
Citation | Darwish AA, M. El-Kattan A, Mahmoud MA, Ragab MT, Hafez AA (2023). Virulence genes and immunological biomarkers for brucellosis in sheep & goat. J. Anim. Health Prod. 11(2): 165-175.
DOI | http://dx.doi.org/10.17582/journal.jahp/2023/11.2.165.175
ISSN | 2308-2801

Copyright: 2023 by the authors. Licensee ResearchersLinks Ltd, England, UK.
This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

INTRODUCTION

Livestock breeding, particularly sheep and goat farming, is a significant source of income for people residing on the Egyptian north coast. However, Brucellosis remains a major challenge for sheep and goat breeders in Egypt and other producing countries. The disease is known to cause infertility, abortion, and stillbirth in various animal species, and it also poses a significant health risk to humans in developing countries like Egypt (Nayel et al., 2020; Akhtar et al., 2021). Controlling Brucellosis is a challenging task, as the bacterium has developed several mechanisms to evade the host's immune system, particularly macrophages. Therefore, analyzing the molecular pathways that Brucella uses to survive within host cells is critical in developing effective strategies for controlling and preventing Brucellosis

(Mohamed et al., 2008).

Brucella is divided into six species based on their animal hosts. In Egypt, *B. melitensis* is the most common species in humans and animals followed by *B. abortus* and *B. suis* (Abdel-Hamid et al., 2020). All Brucella members are closely related to each other, and their pathogenicity depends on the virulence factors (Gandara et al., 2001). The most common virulence-related gene elements in Brucella are Brucella virulence factor A (*bvfA*), *VirB*, and urease gene (*ure*). *BvfA* is concerned with Brucella's ability to stay alive in the host. It is a small 11 kDa periplasmic protein that is unique to the genus Brucella (Lavigne et al., 2005). It may help in setting up the intracellular niche (Lavigne et al., 2005; Mohamed et al., 2008). *VirB* proteins are another virulence factor of Brucella. They are 12 proteins responsible for making up the type IV secretion system (T4SS) thus facilitating Brucella intracellular replication and escaping from the host immune system (Delrue et al., 2004). Urease gene (*ure*) is the virulence factor that helps Brucella to survive in-vivo and in-vitro at low pH. Although Brucella has two different groups of urease genes (*ure1* and *ure2*), *ure1* only codes for an active urease and no one knows the role of *ure2* in Brucella biology (Felix et al., 2010).

The immune response is the body's reaction against pathogens' attacks. Many protein molecules are involved in the immune response, but the domination is for the inflammatory cytokines. They are the main organizers of the immune response. They are the initiators, magnifiers, and terminators of the immune response (Demirdag et al., 2003; Hashem et al., 2020). They are classified into: pro-inflammatory cytokines which stimulate other immune cells to start their functions and coordinate between them and anti-inflammatory immune cytokines which inhibit and prevent inflammation exacerbation. Under their stimuli, the hepatocytes synthesized a group of α and β globulins, called acute phase proteins (APPs) (Shalby et al., 2020). During infection, they try to restrict and limit microbial growth and keep the host body homeostasis till the antibodies form. Free radicals, complement systems, and immunoglobulin are also activated under the effect of the pro-inflammatory cytokines. The pro-inflammatory cytokines and APPs were introduced as herd health indicators and sensitive markers for different pathological conditions and malignancy (El-Boshy et al., 2009).

Keeping in mind these facts, the present study was carried out to find and figure out common genes related to virulence in *B. melitensis* field strains taken from sheep and goats in the Northwest coast of Egypt and assess some immunological, hormonal, and iron profile alterations related to *B. melitensis* infection with especial reference to the pro-inflammatory cytokines and APPs validity as diagnostic markers and predictors for the disease in the two species.

MATERIALS AND METHODS

Animals

After the ethical approval of the Animal and Poultry Health Department, Animal and Poultry Health Division, DRC, Cairo, Egypt, this study was carried out on 260 animals (110 ewes (3-5 years) and 150 does (3-5 years)) with a history of recent abortion, randomly collected from different areas of the Egyptian north coast.

Bacteriological examination

Samples: Vaginal swabs were collected from all animals on Stuart transport medium for bacterial isolation and molecular detection. Swabs were transported in cool conditions to the desert research center's bacteriology laboratory and stored at - 20 °C until processed.

Isolation of Brucella: All bacteriological samples were processed under Biosafety level two (BSL2) with high personal protections as described (OIE, 2009).

About 1 ml of the contents, were grown on a tryptose agar medium with a selective antibiotic supplement (Ewalt et al., 1983) (Oxoid). According to Alton et al (1988), plates were put in an incubator at 37°C with 10% CO2 and checked for growth every day for 15 days. Isolates were identified as Brucella.

Brucella-suspected colonies exhibiting a characteristic spherical, shiny, with intact borders, pinpoint, and have a honey color under transmitted light (Alton et al., 1988; OIE, 2016).

Identification of the isolates: The isolates were preliminarily identified by morphology, urease, and oxidase tests (OIE 2018; Saavedra et al., 2019). Typical isolates smooth colony, Gram-negative coccobacilli, urease-, and oxidase-positive were identified as Brucella spp, and they were stored at –18 °C in a Tryptone Soy Broth (Oxoid CM0129) supplemented with 10% glycerine.

DNA preparation: DNA extraction from samples was performed using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany, GmbH) with modifications from the manufacturer's recommendations. Briefly, 200 µl of the sample suspension was incubated with 10 µl of proteinase K and 200 µl of lysis buffer at 56OC for 10 min. After incubation, 200 µl of 100% ethanol was added to the lysate. The sample was then washed and centrifuged following the manufacturer's recommendations. Nucleic acid was eluted with 100 µl of elution buffer provided in the kit.

Table 1: Primers sequences, target genes, amplicon sizes, and cycling conditions for conventional PCR.

Target gene	Primers sequences	Amplified segment (bp)	Primary denaturation	Amplification (35 cycles)			Final extension	Reference
				Secondary denaturation	Annealing	Extension		
***B. melitensis*- IS711**	AAATCG-CGTCCTTGCTG-GTCTGA TGCCGATCACTTAA-GGGCCTTCAT	731	94°C 5 min.	94°C 30 sec.	54°C 40 sec.	72°C 45 sec.	72°C 10 min	Gupta et al. (2014) Akhtar, , et al 2021
BvfA	ACCCTTCGTCGAT-GTGCTGA	1282	94°C 5 min.	94°C 1 min.	65°C 1 min.	72°C 1.3 min.	72°C 10 min.	Derakh shandeh et al., 2013
	CCGCGCTGAT-TTCATCGCTG							
virB	CGCTGATCTATAAT-TAAGGCTA	881	94°C 5 min.	94°C 30 sec.	54°C 40 sec.	72°C 45 sec.	72°C 10 min.	
	TGCGACTGCCTCC TATCGTC							
Ure	GCTTGCCCTTGAAT-TCCTTTGTGG	2100	94°C 5 min.	94°C 1 min.	65°C 1 min.	72°C 1.3 min.	72°C 10 min.	
	ATCTGCGAATTTGC-CGGACTCTAT							

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Traditional PCR was used to amplify virulence genes of Brucella spp. *BvfA, VirB,* and *Ure* were amplified with the help of specific oligonucleotide primers, Metabion (Germany) (Table 1).

Primers were used in a 25-µl reaction that had 12.5 µl of Emerald Amp Max PCR Master Mix (Takara, Japan), 1 µl of each primer at a concentration of 20 pmol, 5.5 µl of water, and 5 µl of DNA template, the reaction was performed in an applied biosystem 2720 thermal cycler.

Analysis of the PCR Products

Electrophoresis on 1.5% agarose gel (Applichem, Germany, GmbH) in 1x TBE buffer at room temperature with 5V/cm gradients was used to separate the PCR products In each gel slot, 20 µl of the multiplex PCR products were put for gel analysis The sizes of the fragments were figured out by using a gene ruler 100 bp ladder (Fermentas, Germany), a 100 bp DNA ladder H3 RTU (Genedirex), and a gel pilot 100 bp plus ladder (Qiagen, Gmbh, Germany) A gel documentation system (Alpha Innotech or Biometra) took pictures of the gel, and computer software was used to look at the data.

Immunological, hormonal, and iron profile parameters estimation

A 5 ml blood was collected from the Brucella-infected animals (15 ewes and 20 does which were positive for the bacteriological examination and were considered the diseased groups (DG)) and from apparently-healthy animals (Control group (CG); 15 ewes and 20 does with normal ranges of body temperature, respiratory and heart rate, no abortion and were negative for bacteriological examination), and separated into two tubes. The first tube contained heparin (5000 I.U.) to stop the coagulation process while the second tube was plain and the blood was allowed to coagulate. Both samples were centrifuged at 3000 r.p.m for 15 min to obtain heparinized plasma and serum respectively. The heparinized plasma and serum were kept in clean Eppendorf at -80 and used later to determine immunological, hormonal, and iron profile parameters.

Serum pro-inflammatory cytokines (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) were estimated using ELISA kits (MyBioSource Company, San Diego, USA). The plasma fibrinogen (Fb), serum amyloid A (SAA) and serum haptoglobin (Hp) were measured using commercial ELISA kits of IBL International Crop (Canda). The serum caeruloplasmin (Cp) and serum transferrin (Tf) were detected by turbidimetric method using kits purchased from commercial company (Elab Science USA), and serum ferritin was evaluated by Chemiluminescence immunoassay (CLIA) method using the kit procured from Abnova (Taipei, Taiwan).

Serum concentrations of free radicals (malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO)), antioxidants (catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR)), serum iron (SI), and total iron binding capacity (TIBC) were determined spectrophotometrically using commercial kits of Biodiagnostic company (Giza, Egypt).

Serum hormonal assays (cortisol, insulin, TSH, T3, T4, and growth hormone (GH)) were estimated by CLIA method using kits supplied by DiaSorin (Saluggia Italy).

All manual instructions were carefully followed.
- Transferrin saturation percent (TF sat.%) = SI/TIBC*100.
-Unsaturated iron binding capacity (UIBC) = TIBC-SI.

Statistical analysis

Mean values of CG and DG of the same species were compared by independent-samples T test using SPSS® program version 23. A difference was considered significant at P< 0.05.

Graph pad prism version 8 program was used to evaluate the area under the curve (AUC), cut off points, sensitivity, specificity, and likelihood ratio (LR) for the measured cytokines and APPs between DG and CG in the same species.

The positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy rate for them were calculated according to the next equations:

$$PPV = True\ positive \div Total\ positive \times 100.$$

$$NPV = True\ negative \div Total\ negative \times 100.$$

$$Accuracy\ rate = (True\ positive + True\ negative) \div Total\ population \times 100.$$

$$\begin{aligned} Percentages\ of\ increaese\ or\ decrease\ for\ all\ parameters \\ &= (The\ mean\ value\ of\ the\ marker\ concentration\ in\ DG \\ &- The\ mean\ value\ of\ its\ concentration\ in\ CG) \\ &\div The\ mean\ value\ of\ its\ concentration\ in\ CG \times 100. \end{aligned}$$

RESULTS

Isolation and identification of *B. melitensis*

Brucella organisms were obtained from 35 out of 260 vaginal swabs (13.50%) with nearly equal percentages in sheep and goat (15/110 sheep (13.60%), and 20/150 goat (13.33%)). Brucella cultures showed typical characteristics for the genus Brucella. Colonies were spherical, shiny, smooth pinpoint, with intact borders, brilliant surfaces, and have a honey color under transmitted light, Gram-negative coccobacilli, with positive oxidase and urease tests.

Molecular characterization

PCR Assays: Universal PCR in this study confirmed the presence of genetic material of genus *Brucella* in all 35 (100%) DNA extracts from which *Brucella melitensis* has been isolated from their cultures. The assay has amplified the target gene (*B. melitensis*- IS711) with amplification of the fragment of 731 bp (Fig. 1) characteristic for the Genus *Brucella melitensis*, the virulence genes *bvfA*, *virB*, and *ure* genes assays produced at amplicons of 1282, 881, and 2100 bp respectively (Fig. 2,3,4).

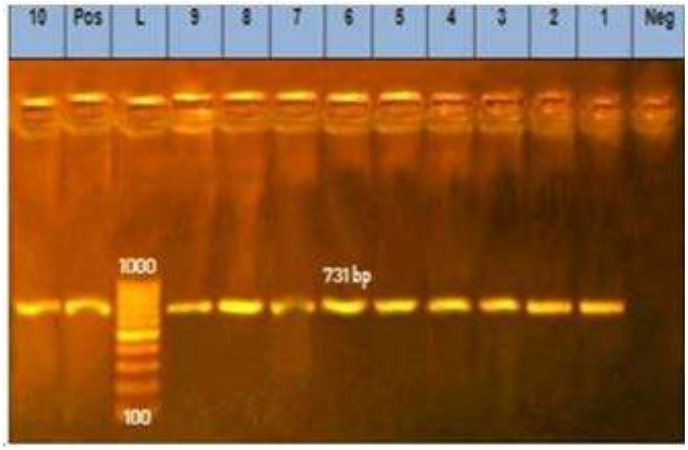


Figure 1: PCR product of IS711 gene amplification Lane 1-10: B. melitensis, lane Pos. positive control lane Neg: negative control. Lane L: molecular marker (100bp-1000bp). All lanes are positive.

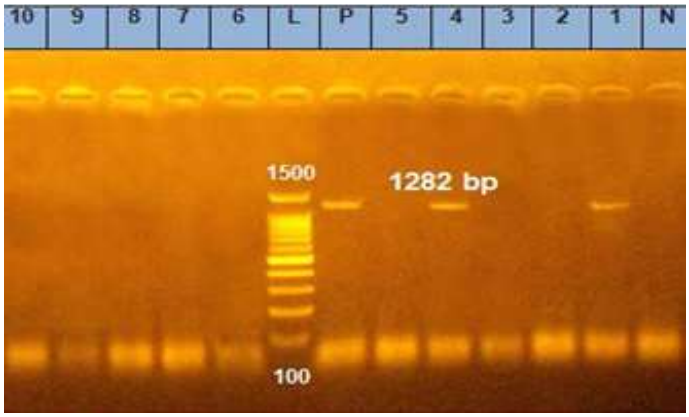


Figure 2: Agarose gel electrophoresis showed amplified fragment of 1282bp of *B. melitensis bvfA* gene. Lane L: molecular marker (100bp- 1500bp), lane N: negative control and lane 1 and 4: positive *B. melitensis bvfA* gene and lanes 2, 3, 5, and 6-10: negative for *B. melitensis bvfA* gene.

PCR for virulence gene

62.8% (22/35) of the isolates carried *bvfA* gene (Fig. 2), *virB* gene was recorded in 77% (27/35) of the isolates (Fig. 3), *ure* gene was detected in 37% (13/35) of the isolates (Fig. 4).

Immunological, hormonal, and iron profile results

Table (2) cleared that *B. melitensis* infection in sheep and goat is associated with a strong innate immune response

Table 2: Comparison between the cytokines, acute phase proteins, oxidant-antioxidant status, hormonal assays and iron profile in diseased and control groups of both species. value= mean ±SD.

Parameter	Sheep		Goat	
	CG	DG	CG	DG
IL-1α (Pg/ml)	31.59±4.10	89.60±6.86*	31.37±2.62	84.90±4.33*
IL-1β (Pg/ml)	28.24±4.34	132.10±9.74*	24.92±2.01	130.20±7.82*
IL-6 (Pg/ml)	29.88±1.98	65.56±2.78*	26.91±2.24	64.98±2.05*
TNF-α (Pg/ml)	27.22±2.97	75.90±4.58*	26.60±1.62	72.86±2.42*
IL-10 (Pg/ml)	102.50±4.04	75.76±8.81*	100.57±2.70	71.63±6.18*
Fb (mg/dl)	127.75±15.33	248.15±14.46*	103.70±3.96	194.90±10.69*
Cp (mg/dl)	3.39±0.83	7.48±0.35*	3.40±0.84	7.48±0.35*
Hp (g/dl)	0.15±0.02	3.12±0.53*	0.13±0.01	2.68±0.29*
SAA (mg/L)	2.76±0.26	6.76±0.64*	2.34±0.32	6.39±0.48*
MDA (nmol/ml)	13.27±0.99	20.94±2.11*	12.50±0.22	19.70±2.09*
NO (µmol/L)	25.66±1.26	40.40±2.11*	22.08±1.60	39.14±2.42*
CAT (U/L)	464.80±30.22	292.20±7.92*	414.01±27.80	288.35±5.60*
GPx (mU/L)	1065±22.42	792.80±15.71*	955.50±30.32	760.60±39.36*
GR (ng/ml)	21.90±0.91	12.36±0.58*	21.35±1.04	12.30±0.55*
Cortisol (µg/dl)	1.76±0.13	7.01±0.41*	1.30±0.06	6.90±0.25*
Insulin (µIU/ml)	8.69±0.28	7.18±0.24*	8.10±0.28	7.06±0.18*
T3(ng/ml)	1.82±0.12	1.03±0.04*	1.72±0.06	1.01±0.04*
T4 (µg/ml)	0.81±0.06	0.70±0.05*	0.78±0.08	0.65±0.03*
TSH (µIU/ml)	0.010±0.002	0.028±0.007*	0.011±0.002	0.028±0.007*
GH (ng/dl)	12.28±1.41	17.26±0.80*	11.82±0.88	17.18±0.70*
SI (µg/dl)	104.89±2.07	94.71±1.78*	103.14±2.02	92.56±1.93*
TIBC (µg/dl)	263.17±21.48	378.04±11.75*	213.17±21.49	328.04±11.75*
UIBC (µg/dl)	158.28±21.26	283.34±11.76*	110.03±21.76	235.48±12.62*
Transferrin(mg/dl)	126.30±2.75	85.60±2.39*	124.45±3.25	81.60±3.28*
Tf sat. %	40.11±3.35	25.07±0.92*	48.87±5.21	28.26±1.43*
Ferritin (ng/ml)	15.85±1.34	23.60±1.54*	15.25±1.12	22.40±1.54*

Significant differences in the values between the diseased groups and the control groups of the same species were indicated by (*) at $P < 0.05$.

IL-1α: interleukin 1 alpha, IL-1β: interleukin 1 beta, IL-6: interleukin 6, TNF-α: tumor necrosis alpha, IL-10: interleukin 10, Fb: fibrinogen, Cp: caeruloplasmin, Hp: haptoglobin, SAA: serum amyloid A, MDA: malondialdehyde, NO: nitric oxide, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase, TSH: thyroid stimulating hormone, GH: growth hormone, SI: serum iron, TIBC: total iron capacity, UIBC: unsaturated iron binding capacity, Tf sat. %: transferrin saturation %.

CG: control group, DG: diseased group.

Table 3: Cut off points, sensitivity%, specificity%, likelihood ratio (LR), PPV%, NPV%, accuracy rate (AR) and percentages of increase (+) or decrease (-) of the estimated pro-inflammatory cytokines (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α) and acute phase proteins (Fb, Cp, Hp, SAA, transferrin, ferritin) in DG compared to CG (of the same species).

Parameter	Species	Cut off	Sensitivity	Specificity	LR	PPV	NPV	AR	% of (+,-)
IL-1α (Pg/ml)	Sheep	37.11	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	183.63%
	Goat	30.35	100%	95%	20	95.24%	100%	97.50%	170.64%
IL-1β (Pg/ml)	Sheep	37.63	100%	95%	20	95.24%	100%	97.50%	367.77%
	Goat	29.44	100%	95%	20	95.24%	100%	97.50%	422.47%
IL-6 (Pg/ml)	Sheep	32.66	100%	95%	20	95.24%	100%	97.50%	119.41%
	Goat	30.11	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	141.47%

TNF-α (Pg/ml)	Sheep	31.00	100%	85%	6.67	86.96%	100%	92.50%	178.84%
	Goat	28.73	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	173.91%
Fb (mg/dl)	Sheep	144.50	100%	95%	20	95.24%	100%	97.50%	94.25%
	Goat	109	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	87.95%
Cp (mg/dl)	Sheep	4.40	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	120.64%
	Goat	4.40	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	120%
Hp (g/dl)	Sheep	0.1850	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	1980%
	Goat	0.1450	100%	80%	5	83.33%	100%	90%	1961.54%
SAA (mg/L)	Sheep	2.96	100%	80%	5	83.33%	100%	90%	144.93%
	Goat	2.84	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	173.08%
Transferrin(mg/dl)	Sheep	123.00	100%	90%	10	90.91%	100%	95%	-32.22%
	Goat	121.00	100%	75%	4	80%	100%	87.50%	-34.43%
Ferritin (ng/ml)	Sheep	17.50	100%	85%	6.67	86.96%	100%	92.50%	48.90%
	Goat	16.50	100%	85%	6.67	86.96%	100%	92.50%	46.89%

LR= 0.5-5: low; LR=5-10: moderate; LR>10: high.
IL-1α: interleukin 1 alpha, IL-1β: interleukin 1 beta, IL-6: interleukin 6, TNF-α: tumor necrosis alpha, IL-10: interleukin 10, Fb: fibrinogen, Cp: caeruloplasmin, Hp: haptoglobin, SAA: serum amyloid A.

indicated by the significant (P<0.05) increase in the concentrations of the pro-inflammatory cytokines (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α), APPs (Fb, Cp, Hp, SAA), free radicals (MDA, NO), and the significant (P<0.05) decline in the levels of the anti-inflammatory cytokine (IL-10) and anti-oxidants (CAT, GPx, GR) in the DGs compared to CGs. In parallel, a significant (P<0.05) elevation in cortisol, GH, and TSH concentrations while, insulin, T3, and T4 levels significantly (P<0.05) decreased in DGs compared to CGs. The iron profile of both species, showed a significant (P<0.05) hypoferremia, hyperferritinemia, hypotransferrinemia, increased TIBC, UIBC, and decreased Tf sat.% in DGs when compared to CGs.

Concerning the diagnostic value of the estimated pro-inflammatory cytokines and APPs, Table (3) clarified that all of the yielded high values of sensitivity, specificity, PPV, NPV, and AR and moderate to high LRs in both species, (except SAA in sheep and Hp and Tf in goat). Ordering them according to LR, IL-1β, IL-6, Fb were the best markers for sheep brucellosis (LR=20) followed by IL-1α, Cp, Hp, Tf (LR=10), then ferritin, TNF-α, SAA with LR as 6.67, 6.67 and 5 respectively. On the other hand, IL-1β, IL-1α were the best indicators for caprine brucellosis (LR=20) followed by IL-6, TNF-α, Fb, Cp, SAA (LR=10) then ferritin, Hp, Tf with LRs as 6.67, 5, 4 respectively. While, the percentage of increase strongly recommended Hp as the best marker for brucellosis in both species followed by IL-1β.

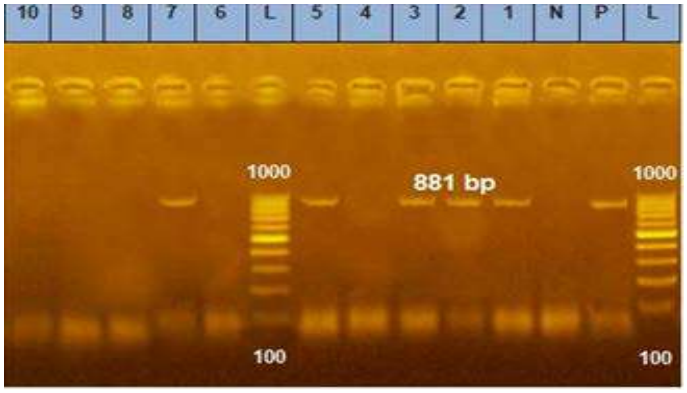


Figure 3: Agarose gel electrophoresis showed amplified fragment of 881bp of *B. melitensis virB* gene. Lane L: molecular marker (100bp- 1000bp), lane N: negative control and lane 1,2,3, 5 and 7: positive *B. melitensis virB* gene and lanes 4, 6, 8,9,10: negative *B. melitensis virB* gene.

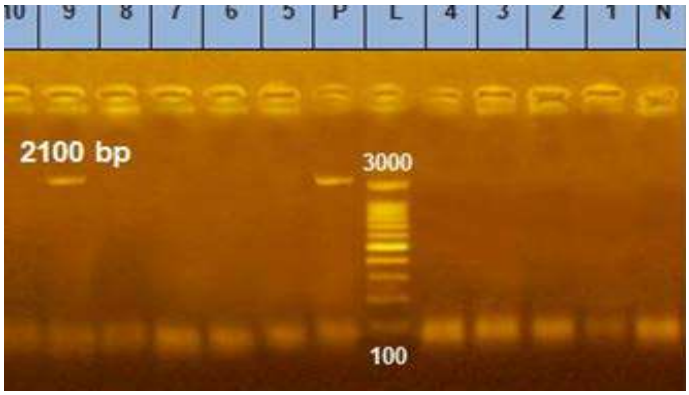


Figure 4: Agarose gel electrophoresis showed amplified fragment of 2100bp *B. melitensis ure* gene. Lane L: molecular marker (100bp- 3000bp), lane P positive control, lane N: negative control and lane 9: positive *B. melitensis ure* gene and Lanes 1-8, and 10 are negative *B. melitensis ure* gene.

DISCUSSION

Brucella is a gram-negative facultative intracellular coccobacillus, it has a unique ability to adapt to the conditions it finds inside the host cells. It changes over time to avoid and trick the host immune system by interfering with intracellular trafficking, resisting the respiratory burst, and adapting to the oxygen deprivation inside macrophages (Mohamed et al., 2008; El-Boshy et al., 2009). The total recovery rate of *B. melitensis* in our study was 13.5% (35/260) with nearly equal percentages in both species as 13.60% (15/110) in sheep and 13.33% (20/150) in goat. Similar recovery rates of *B. melitensis* were obtained before from milk samples and vaginal swabs collected from goats in Jordan (Samadi et al., 2010), vaginal exudate of goats in Mexico (Herrera et al., 2011), and vaginal swabs, spleen, and uterine fluid from goats in Peninsula Malaysia (Bamaiyi et al., 2012). Higher percentages of *B. melitensis* were recovered from cattle-milk samples in Iraq by Esmaeel (2019) as 18%, milk samples in Egypt by Aman et al. (2020) as 21.5%, goat and sheep milk as 35% and vaginal swabs as 62.5% in Iran by Shakerian et al. (2016), and lower percentage was recovered from aborted goat in Ethiopia as 7.8% by Tekle et al. (2019). Variations in the incidence of infection are related to, the fastidious nature of Brucella species, the stage of the disease, the number of shed bacteria through discharge, the course of the diseases, locality, rate of exposure, reproductive status, the improvements in diagnostic techniques, vaccination strategies and the enforcement of a national eradication policy (Nada et al., 1992; Luna-Martinez and Mejia-Teran, 2002).

The results of this study showed that most *B. melitensis* isolates have virulence factor genes (*bvfA, virB,* and *ure*) in their genome. We found that 62.8% of *B. melitensis* isolates had *bvfA* genes, this percentage is similar to the percentage reported by Lavigne et al. (2005) and lower than the percentages recorded by Derakhshandeh et al. (2013), Hamdy and Zaki (2018), and Aman et al. (2020) who found *bvfA* genes in *B. melitensis* isolated from sheep, goats, and cattle in Egypt by percentages of 78.5%, 92.3%, and 79% respectively. They attributed this high prevalence of virulence-associated *bvfA* genes in the *B. melitensis* isolates to the potential virulence of this bacterium and the role of *bvfA* in the intracellular Brucella replication.

In this investigation, 77 % of *B. melitensis* isolates had *virB* gene. Derakhshandeh et al. (2013) and Aman et al. (2020) recorded percentages of *virB* gene close to ours as 73.8% and 74% respectively in *B. melitensis* recovered from aborted fetuses of sheep and goats in Iran and raw milk in Egypt. On the other hand, Hamdy and Zaki (2018) found *virB* genes in 96.2% of *B. melitensis* isolated from different samples of sheep, goats, and cattle in Egypt. While, Esmaeel (2019) obtained *virB* gene in only 37.5% of *B. melitensis* recovered from cattle milk in Iraq. *VirB* gene coded for Brucella's T4SS, which is a major factor in Brucella virulence. It hides Brucella from the host immune system and keeps it alive inside cells and facilitates its intracellular replication (Delrue et al., 2004; den Hartigh et al., 2008; Saeedzadeh et al., 2012). 37% of *B. melitensis* isolates in the present study had *ure* gene, this percentage is much lower than Derakhshandeh et al. (2013), Aman et al. (2020), and Abdel-Hamid et al. (2020) who found *ure* gene in 88%, 88%, and 91.7% of *B. melitensis* isolates. This discrepancy in results of *ure* gene may be due to the difference of the sources, the number of samples, and the areas that were looked at. *Ure* gene has an important role in the microbes' survival, it breaks down urea into carbon dioxide and ammonia to make the environment around it more alkaline and makes it easier for cells to live in acidic environments (Seleem et al., 2008; Bandara et al., 2007).

The interaction between the host and *B. melitensis* organism in the current work successfully evoked a prominent innate immune response in both infected species. It was indicated by the outstanding increase of the pro-inflammatory cytokines (IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α) concentrations in the diseased ewes and does. These results coincided with Demirdag et al. (2003), and Hashem et al. (2020) who noted elevated activities of TNF-α, IL-1β, and IL-6 in humans, cow, and sheep brucellosis. The pro-inflammatory cytokines are the main triggers of the inflammatory immune response. They are defined as small glycoproteins, nonspecifically released from various immune cells during different types of infection, especially bacterial ones. They coordinate other immune cells functions to initiate and exacerbate an inflammatory immune response. IL-1β and TNF-α, are the most important pro-inflammatory cytokines during Brucella infection. As IL-1β influences the adhesion factors expression on endothelial cells to facilitate the leukocytes (pathogen killers) migration to sites of infection (Nicklin et al., 2000). While TNF-α is essential for optimal Brucella killing by macrophages. TNF-α also enhances IFN-γ production, which stimulates macrophages generation with strong intracellular Brucella-killing activity (Seder and Hill, 2000; Murphy et al., 2001). Additionally, IFN-γ-induced T-cell responses widely participate in the immunity against intracellular *B. abortus* (Saunders et al., 2000).

In contrast to our results, El-Boshy et al. (2009) reported diminished levels of TNF-α, IFN-γ, and IL-1α and non-significant changes in IL-6 concentrations in Brucella-infected camels. He attributed this result to the pronounced increased IL-10 concentrations, he obtained. As the enhanced lipid peroxidation usually recorded with brucellosis, encourages IL-10 transcription. IL-10 has an-

ti-inflammatory characters and greatly downregulates the action of the pro-inflammatory cytokine. It also suppresses the antigen presentation capacity of antigen-presenting cells. Thus, IL-10 helped Brucella to escape from the host protective immune mechanisms. Furthermore, it was found that in-vivo IL-10 neutralization with an anti-IL-10 monoclonal antibody lead to a fewer bacteria count (up to 10 folds) in mice infected with a virulent *B. abortus* strain (Fernandes and Baldwin, 1995). Logically, the marked decline in IL-10 levels in the diseased groups of both species here, explained the augmentation of the inflammatory immune response in this work.

Subsequently, a marked increase in the acute phase proteins concentrations (Fb, Cp, Hp, SAA) was recorded in both infected species in the present study. APPs are another type of innate non-specific immunity. They are synthesized by hepatocytes and released in the peripheral blood, under the effect of the above-mentioned activated pro-inflammatory cytokines in different pathological conditions. They are also involved in some physiological conditions like pregnancy and parturition. Generally, they are charged with maintaining hemostasis and microbial growth limitation till antibodies production. According to their concentrations in the blood during infection, they are classified into positive APPs (usually increase during infection) and negative APPs (usually decrease during infection). They were suggested as reliable biomarkers for different diseases in animal and human as well. They are affected by species, sex and age. APR is a common finding in brucellosis in different species, it was indicated before in humans by elevated CRP and Fb levels (Uluğ et al., 2010), in cows by increased SAA and Hp concentrations (Sharifiyazdia et al., 2012), in does by raised C reactive protein values (Mahboub et al., 2013), in camels by hyperhaptoglobinemia (Hamdy et al., 2019) and in sheep by hyperfibrinogenemia (Shalby et al., 2020).

Another product for the activation of the pro-inflammatory cytokine in this work is free radicals generation (MDA and NO). Free radicals are non-stable atoms that steal electrons from their neighbors to achieve their chemical stability. Thus, they transform their neighbors into free radicals and a series of oxidative reactions begins. Basically, they have potent antimicrobial properties via pathogen component oxidation. They are produced from the host macrophage and neutrophils in response to the circulating pro-inflammatory cytokines as a part of their innate immunity. Under normal conditions, they are efficiently controlled by anti-oxidants. Unfortunately, the anti-oxidant depletion (CAT, GPx, GR) in the present report referred to free radicals massive production and subsequent anti-oxidant exhaustion. Hence, the free radicals start attacking different body cells causing severe organs damages and oxidative stress appears. In this aspect, many researchers confirmed the great contribution of oxidative stress in the brucellosis pathogenesis in different animal species (Kataria et al., 2010; Bozukluhan et al., 2017; Merhan et al., 2017; Shalby et al., 2020).

Not only are the immune components affected by the aforesaid pro-inflammatory cytokines activation, but also the endocrine system. Prior investigations threw light on the profound impact of the immune system on the endocrine system. As the invigorated pro-inflammatory cytokines, especially IL-1β and TNF-α, induce the anterior pituitary gland to secret more ACTH hormone which stimulates glucocorticoids secretion from the adrenal gland (Gentilini et al., 2015; Gentilini et al., 2019). In accordance with this theory, a marked hypercortisolemia was observed in the diseased ewes and goats in this study. Subsequently, decreased insulin, T3, and T4 levels and increased growth hormone concentrations were detected in the Brucella-infected animals. As cortisol inhibits insulin secretion by interfering with Zn metabolism and insulin signaling, causes partial thyroid dysfunction and increases growth hormone production and secretion (Stratakis et al., 2006; Morais et al., 2019; Cai et al., 2020). This action was mainly to reverse the hypoglycemia usually recorded with brucellosis (Hashem et al., 2020). While, the little elevation observed in TSH concentrations in the diseased animals, may be assigned to the pituitary response to the decreased T3 and T4 levels.

Interestingly, the iron profile of the diseased animals in the current study was also a reflection of the above-described pro-inflammatory cytokines activation. The pro-inflammatory cytokines restrict pathogens ability to obtain the iron required for their growth and multiplication through several mechanisms. Such as, induction of anorexia, inhibition of intestinal iron absorption, increasing ferritin formation, enhancing hepcidin synthesis, and decreasing transferrin (Arica et al., 2012; Ganz et al., 2015; Ganz, 2018; Salem et al., 2020). Therefore, considerable hypoferemia, hyperferritinemia, and hypotransferenemia were obtained in both diseased species here. In parallel to the hypoferemia, TIBC and UIBC markedly increased and Tf sat. % decreased. The acute phase response, commonly noticed with brucellosis, may be another cause for these changes as ferritin is a positive acute phase reactant and transferrin is a negative acute phase reactant (Arica et al., 2012; Salem et al., 2020).

Regarding the importance of the estimated pro-inflammatory cytokines and APPs as biomarkers for brucellosis, all of them achieved high sensitivity, specificity, PPV, NPV, and AR and moderate to high LR (except SAA in sheep and Hp and Tf in goats). The best markers among them were IL-1β, IL-6, and Fb for ovine brucellosis and IL-1β

and IL-1α for caprine brucellosis. The calculation of these markers' percentages of increase, strongly nominated Hp as the best indicator for the disease in both species and supported using IL-1β as an indicator for brucellosis in both species. These results were concomitant with previous opinions, suggested the pro-inflammatory cytokines and APPs as sensitive biomarkers for brucellosis in different species and disagreed with the markers` superiority in the disease diagnosis (Demirdag et al., 2003; El-Boshy et al., 2009; Uluğ et al., 2010; Sharifiyazdia et al., 2012; Mahboub et al., 2013; Hamdy et al., 2019; Hashem et al., 2020; Salem et al., 2020; Shalby et al., 2020). This variation may be attributed to the disease stage, Brucella species, host species, geographical distribution, and the feeding system.

CONCLUSION

The study confirmed the existence of *Brucella melitensis* in vaginal swabs of sheep and goat and attributed its virulence to the presence of the *bvfA, virB,* and *ure* virulence genes. *B. melitensis* elicits a prominent innate immune response in sheep and goat which deeply contributed to the hormonal and iron profile alterations associated with the disease. Knowing these alterations may be helpful in modifying disease-supportive treatment protocols. IL-1β, IL-6, Fb, and Hp are good markers for ovine brucellosis while, IL-1β, IL-1α, and Hp are good indicators for caprine brucellosis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank members of the Animal and Poultry Health Department, Desert Research Center, Cairo, Egypt.

CONFLICT OF INTEREST

Authors have no conflict of interest.

NOVELTY STATEMENT

This research investigated the virulence genes in *B. melitensis* isolates obtained from vaginal swabs of sheep and goat and the most important immunological, hormonal, and iron profile alterations related to its infection. It also suggested new markers for brucellosis in both species.

AUTHORS CONTRIBUTION

All authors are equally contributed.

REFERENCES

Akhtar, Rahoela et al. (2021). Genotyping of Brucella strains isolated from humans and cattle of different geographical regions of Pakistan using MLVA-15. Vet. Med. Sci. 7.5 (2021): 1688-1695.

Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. 1st ed. INRA. Paris.

Aman I., AL-Hawary I., Helmy N., EL-Gushi A. (2020). Detection of Brucella organisms from Egyptian raw milk using cultural and molecular techniques. Kafrelsheikh Vet. Med. J., 18(2): 14-19.

Arica V, Şilfeler İ, Arica S, Tutanç M, Motor VK, İnci M (2012). Brucellosis with very high ferritin levels: report of five cases. Hum. Exp. Toxicol. 31(1):104-6. https://doi.org/10.1177/0960327111414281. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21708883.

Abdel-Hamid NH, El-bauomy EM,Ghobashy HM, Shehata AA. (2020). Genetic variation of Brucella isolates at strain level in Egypt. Vet. Med. Sci., 6(3): 421– 432.

Bamaiyi PH, Hassan L, Khairani-Bejo S, Zainal Abidin M, Ramlan M, Krishnan N, Adzhar A, Abdullah N, Hamidah N HM, Norsuhanna MM, Hashim SN (2012). Isolation and molecular characterization of *Brucella melitensis* from seropositive goats in Peninsula Malaysia. Trop. Biomed. 29(4):513-8. PMID: 23202595.

Bandara A.B., Contreras A., Contreras-Rodriguez A., Martins A.M., Dobrean V., Poff-Reichow S., Rajasekaran P., Sriranganathan N., Schurig G.G., Boyle S.M. (2007). *Brucella suis* urease encoded by ure1 but not ure2 is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. BMC Microbiol. 7:57. https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-57.

Bozukluhan K, Merhan O, Celebi O, Buyuk F, Ogun M, Gokce G. (2018). Levels of certain biochemical and oxidative stress parameters in cattle with Brucellosis. Journal of the Hellenic Vet. Med. Societ., 68(3): 285–290. https://doi.org/10.12681/jhvms.15470

Cai R, Zhou W, Jiang L, Jiang Y, Su T, Zhang C, Zhou W, Ning G, Wang W (2020). Association between thyroid function and serum cortisol in cortisol-producing adenoma patients. Endocrine. 69(1):196-203. https://doi.org/10.1007/s12020-020-02278-5. Epub 2020 Apr 14. PMID: 32291738.

Delrue RS, Lestrate L, Tibor A, Letesson JJ, Bolle XD (2004). Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. FEMS Microbiol. Lett. 231:1-12

Demirdağ, K, Ozden M, Kalkan A, Godekmerdan A, Kilic S (2003). Serum cytokine levels in patients with acute brucellosis and their relation to the traditional inflammatory markers. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 39: 149-53.

den Hartigh A.B., Rolan H.G., de Jong M.F., Tsolis R.M. (2008). VirB3-VirB6 and VirB8- VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence Brucella in the reticuloendothelial system. J. Bacteriol. 190: 4427-4436.

Derakhshandeh A., Firouzi R., Goudarztalejerd A. (2013). Detection of virulence genes (bvfA, virB and ure) in *Brucella melitensis* isolated from aborted fetuses of sheep and goats. Iranian J. Microbiol., 5(4): 402.

El-Boshy M., Abbas H, El-Khodery S, Osman S. (2009). Cytokine response and clinicopathological findings in Brucella infected camels (*Camelus dromedarius*). Vet. Med., 54: (1): 25–32.

Esmaeel J.R. (2019). Molecular identification of *Brucella abortus* and its virulence genes (bvfA, virB, and ure) in infected humans and cattle from Al-Diwaniyah province, Iraq. Ann. Trop. Med. Health., 22: 21-32.

Ewalt D. R., Packer R. A., Harris S. K. (1983). An improved selective medium for isolating Brucella sp. from bovine milk, p. 577–589 In Proceedings of the Third International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA [Google Scholar]

Felix JS, Ana MC, Asuncion S, Juan MG (2010). *Brucella abortus* ure2 region contains anacid-activated urea transporter and a nickel transport system. BMC Microbiol. 10:107.

Fernandes D.M., Baldwin C.L. (1995). Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. Infect. Immun., 63: 1130–1133.

Gandara B., Merino A.L., Rogel M.A., Martinez-Romero E. (2001). Limited genetic diversity of Brucella spp. J. Clin. Microbiol. 39: 235-240.

Ganz T, Nemeth E (2015). Iron homeostasis in host defence and inflammation. Nat Rev Immunol. 2015 Aug;15(8):500-10. doi: 10.1038/nri3863. Epub 2015 Jul 10. PMID: 26160612; PMCID: PMC4801113.

Ganz T (2018). Iron and infection. Int. J. Hematol. 107:7–15 https://doi.org/10.1007/s12185-017-2366-2.

Gentilini MV, Velásquez LN, Barrionuevo P, Arriola Benitez PC, Giambartolomei GH, Delpino MV (2015). Adrenal steroids modulate the immune response during *Brucella abortus* infection by a mechanism that depends on the regulation of cytokine production. Infect Immun. 83(5):1973-82. doi: 10.1128/IAI.03090-14. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25733519; PMCID: PMC4399066.

Gentilini MV, Giambartolomei GH, Delpino MV (2019). Adrenal Steroids Modulate Fibroblast-Like Synoviocytes Response During *B. abortus* Infection. Front. Endocrinol. 10:722. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00722.

Gupta V.K., Shivasharanappa N., Vijay Kumar, Ashok Kumar. (2014). Diagnostic evaluation of serological assays and different gene-based PCR for detection of *Brucella melitensis* in goat. Small Rumin. Res. 117(1):94-102.

Hamdy M, Khoudair RM, Ibrahim MA, Shalby NA, El-Shafei, AA, Abo El-Maaty AM, Abd El Hameed AR and, Mohamed RH. Acute Phase Proteins (APP) and Minerals Levels Associated with Brucellosis in CamelsAcute Phase Proteins (APP) and Minerals Levels Associated with Brucellosis in Camels. Anim. Health Res. J. Vol. 7, No. 4, November 2019 pp. 732-741.

Hashem MA, El-Mandrawy SA, El-Diasty MM, Zidan AZ (2020). Hematological, Biochemical and Immunological Studies on Brucellosis in Cows and Ewes in Dakahlia and Damietta Governorates, Egypt. Zag Vet. J., 48 (1): 23-35, March 2020.

Herrera E, Rivera A, Palomares EG, Hernández-Castro R, Díaz-Aparicio E (2011). Isolation of *Brucella melitensis* from a RB51-vaccinated seronegative goat. Trop. Anim. Health Prod. 43(6):1069-70. https://doi.org/10.1007/s11250-011-9822-4. Epub 2011 Apr 1. PMID: 21455694.

Kataria N, Kataria A, Maan R, Gahlot AK (2010). Evaluation of oxidative stress in brucella infected cows. J. Stress Physiol. Biochem., 6 (2): 19-25 ISSN 1997-0838.

Lavigne JP, Patey G, Sangari FJ, Bourg G, Ramuz M (2005). O'Callaghan D, et al. Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. Infect. Immun. 73:5524-5529.

Luna-Martinez J.E., C. Mejia-Teran, (2002). Brucellosis in Mexico: Current status and trends. Vet. Microbiol., 90: 19-30.

Mahboub HD, Helal MA, Abd Eldaim MA, Abd El-Razek EM, Elsify AM (2013). Seroprevalence of Abortion Causing Agents in Egyptian Sheep and Goat Breeds and Their Effects on the Animal's Performance. J. Agricult. Sci. 5(9) ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760. Published by Canadian Center of Science and Education

Merhan O, Bozukluhan K, Kuru M, Büyük F, Özden Ö, Kükürt A (2017). Investigation of oxidative stress Index and lipid profile in cattle with Brucellosis. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 23 (6): 933-937. https://dx.doi.org/10.9775/kvfd.2017.18004.

Mohamed NS, Stephen MB, Nammalwar S (2008). Brucella: Apathogen without classic virulence genes. Vet. Microbiol. 129: 1-14

Morais JBS, Severo JS, Beserra JB, de Oiveira ARS, Cruz KJC, de Sousa Melo SR, do Nascimento GVR, de Macedo GFS, do Nascimento Marreiro D (2019). Association Between Cortisol, Insulin Resistance and Zinc in Obesity: a Mini-Review. Biol. Trace Elem. Res. Oct;191(2):323-330. https://dx.doi.org/10.1007/s12011-018-1629-y. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30617901.

Murphy E.A., Sathiyaseelan J., Parent M.A., Zou B., Baldwin C.L. (2001). Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. Immunology., 103: 511–518.

Nada A.R., S.I. Shalaby, W.M. Ahmed (1992). Minerals and trace elements blood profile of Brucella infected, pregnant and non-pregnant animals. Egypt J. Comp. Pathol. Clin. Pathol., 1.5: 2-2.

Nayel M, Ibrahim R, Zaghawa A, Abd El- Maksoud A, Elsify A, Salama A , Kamr A, Mousa W, Eldesoukey I, Shaker A (2020). Seroprevalence and Associated Risk Factors of Brucellosis among Sheep, Goats and Camels in North Western Coastal Area of Egypt. J. Curr. Vet. Res., 2(1): 25-34. https://dx.doi.org/10.21608/JCVR.2020.90220.

Nicklin M.J., Hughes D.E., Barton J.L., Ure J.M., Duff G.W. (2000). Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene. J. Experimen. Med., 191: 303–312.

(OIE). (2009) Office International des Epizooties Bovine Brucellosis; caprine and ovine brucellosis and porcine brucellosis. In: World assembly of delegates of the OIE chapter 2.4.3. Paris: OIE Terrestrial Manual; p. 1–35.

OIE. (2016) Brucellosis (*Brucella abortus, B. melitensis* and *B. suis*), Chapter 2.1.4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Office International des Epizooties, Paris.

OIE (2018). World Organisation for Animal Health. Brucellosis (infection with *B. abortus, B. melitensis* and *B. suis*). In: OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris;. p. 355-98.

Saavedra MJ, Fernandes C, Queiroga C (2019). Laboratory diagnosis of brucellosis. In: Simomes JCC, Saavedra MJ,Hunter PA, editors. Brucellosis in goats and sheep: An endemic and re-emerging old zoonosis in the 21 st century. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2019. p. 15180.

Saeedzadeh A., Sharifiyazdi H., Firouzi R. (2012) Molecular. characterization of *Brucella melitensis* Rev.1 strain in aborted sheep and goats in Iran. Comp. Clin. Pathol. 22: 409-412.

Salem A, Ayady E , Amran Y , Alhasanat M (2020). High Serum Ferritin as a Sensitive Biomarker for Diagnosing, Follow up and Management Responsiveness for Brucellosis. J. Med. Sci. Clin. Res. 8(7): 99-102. https://dx.doi.org/10.18535/jmscr/v8i7.20

Samadi A, Ababneh MMK, Giadinis ND, Lafi SQ (2010). Ovine and caprine Brucellosis (*B. melitensis*) in aborted animals in Jordanian sheep and goat flocks. Vet. Med. Int. https://doi.org/10.4061/2010_458_695.

Saunders B.M., Liu Z., Zhan Y., Cheers C. (1993). Interleukin-6 production during chronic experimental infection. Immunol. Cell Biol., 71: 275–280.

Saunders B.M., Frank A.A., Orme I.M., Cooper A.M. (2000). Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. Infect. Immun., 68, 3322–3326.

Seder R.A., Hill A.V. (2000). Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. Nature, 17, 793–798.

Seleem, M.N., Stephen, M.B. and Nammalwar, S.2008. Brucella: A pathogen without classic virulence genes. Vet. Microbiol. 129, 1-14.

Shakerian A, Deo P, Rahimi E, Shahjavan A, Khamesipour F (2016). Molecular detection of Brucella melitensis in sheep and goat milk in Iran. Trop. J. Pharmaceut. Res. 15 (5): 913-918. http://www.tjpr.org http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i5.3.

Shalby NA, Abo El-maaty AM, Ali AH, El gioushy M (2020). Acute phase biomarkers, oxidants, and trace minerals of mobile sheep flocks naturally infected with brucellosis. Bulgarian J. Vet. Med., ISSN 1311-1477; https://dx.doi.org/10.15547/bjvm.2020-0002.

Sharifiyazdia H, Nazifi S, Nikseresht K, Shahriari R (2012). Evaluation of Serum Amyloid A and Haptoglobin in Dairy Cows Naturally Infected with Brucellosis. J. Bacteriol. Parasitol 3:157. https://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.1000157.

Stratakis CA (2006). Cortisol and growth hormone: clinical implications of a complex, dynamic relationship. Pediatr Endocrinol. Rev. Apr;3 Suppl 2:333-8. PMID: 16675933.

Tekle M., Legesse M., Edao B.M. et al. (2019). Isolation and identification of Brucella melitensis using bacteriological and molecular tools from aborted goats in the Afar region of north-eastern Ethiopia. BMC Microbiol. 19: 108 (2019). https://doi.org/10.1186/s12866-019-1474-y

Uluğ M, Can-Uluğ N, Selek Ş (2010). Levels of Acute Phase Reactants in Patients with Acute Brucellosis. Klimik Dergisi 23(2): 48-50.

Pakistan J. Zool., vol. 56(1), pp 33-39, 2024 **DOI**: https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20230311140332

Isolation, Identification and Antibacterial Resistance Spectrum of Bacterial Pathogens of Respiratory Tract Infection in a Large-Scale Cattle Farm

Yunxia Guo[1], Xia Zhou[1]*, Xin Huang[2] and Fagang Zhong[2]

[1]*College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China.*
[2]*State Key Laboratory of Sheep Genetic Improvement and Healthy Breeding, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation Sciences, Shihezi 832000, China.*

Article Information
Received 11 March 2023
Revised 25 April 2023
Accepted 12 May 2023
Available online 21 July 2023 (early access)
Published 01 December 2023

Authors' Contribution
YG collected the experimental data. XZ conceived the research project. XH and FZ assisted in data analysis, as well as in writing of manuscript.

Key words
Respiratory tract infections, Antimicrobial, Susceptibility, Bovine, Pneumonia

ABSTRACT

The current study aimed to report the bacterial pathogens and their antibacterial resistance spectrum causing bovine respiratory tract infections in a large-scale cattle farm. Nasopharyngeal swabs were collected from animals (n=122) having clinical manifestations of respiratory tract diseases. Standard culture procedure followed by the Kirby-Bauer disc diffusion assay was applied to calculate the antimicrobial resistance profile of bacterial isolates. The survey results showed that bronchitis and bronchopneumonia were commonly occurring respiratory diseases in cattle. The highest incidence of bacterial organism *Staphylococcus aureus* (83.6%), followed by *Streptococcus pneumoniae* (80.3%) and *Klebsiella pneumoniae* (77.0%) were recorded in the respiratory tract samples. *Pasteurella multocida, Bacillus obstructivus* and *Mycoplasma alkalescens* exhibited 100% resistance against penicillin, while *Bacillus subtili* and *M. alkalescens* showed 100% resistance against tetracycline. *Mycoplasma dispar, B. subtilis, M. alkalescens, B. obstructivus,* and *Stah. aureus* against cefoxitin; and *M. alkalescens,* and *Microccus luteus* against cefoperazone exhibited ≥90% resistance. Overall, the majority of bacterial isolates exhibited ≥70% resistance against many antimicrobials. The antimicrobial spectrum profiles whistle an alarming situation for the regulatory bodies to cut the non-judicial use of antimicrobial agents.

INTRODUCTION

China is contributing about 3.8% of world raw dairy milk production, with an estimated volume of 32 million tons during the year 2019. Dairy cattle are facing many infectious pathogens associated with numerous body systems like respiratory, gastrointestinal, urogenital etc. (Silva and Bittar, 2019). Respiratory tract infections account for 6% of total global infections (Ghimire *et al*., 2022). An upsurge in respiratory diseases has been reported in winter; while other contributing factors include unhygienic bedding, environmental pollution, malnutrition and managemental issues (Kumar *et al*., 2014).

A number of infectious agents were recognized as etiological agents of respiratory diseases, including bacteria, virus, yeast, and protozoans. Bacterial infections are frequent as compared to other infections; however, they affect a smaller group of the population (Carvajal and Perez, 2020). It has been estimated that normal microbiomes of respiratory tract like *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* etc., could be involved in respiratory tract infections (Prat and Lacoma, 2016). *Mannhemia haemolytica, Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* were isolated as common pathogens of bovine respiratory tract infections (Confer, 2009). Though, these pathogens are the commensals of nostril and nasopharynx (upper respiratory tract) in healthy cattle, and became opportunistic when host defenses are compromised (Timsit *et al*., 2013). *Mycoplasma dispar, Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovirhinis* were isolated from sick cattle as well (Friis, 1980). Co-infection of many of these bacterial pathogens along with potential viruses may contribute to bovine respiratory disease (BRD), one of the most devastating diseases of the cattle industry globally (Gaudino *et al*., 2022).

* Corresponding author: xzhou88@yahoo.com
0030-9923/2024/0001-0033 $ 9.00/0

Copyright 2024 by the authors. Licensee Zoological Society of Pakistan.
This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Since the beginning of the 21st century, the problem of antimicrobial resistance is becoming alarming day-by-day. Studies have demonstrated the association between antibiotic use and prevalence of resistance in microbial organisms (Catry *et al*., 2016; Donaldson *et al*., 2006). Data from food-producing animal farms have demonstrated that many farmers use a deviated dose of antimicrobials than those labeled on the leaflet (Timmerman *et al*., 2006), which potentially convert microbiota into bugs (Dewulf *et al*., 2007).

Many variations in antimicrobial resistance profiles of Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae and other pathogenic bacteria have been observed between different bovine herds (Tikofsky *et al*., 2003; Catry *et al*., 2005; Bokma *et al*., 2020; Haley *et al*., 2020). It potentially reflects the antimicrobial use in any particular area, and may alarm the various stakeholders of clinical relevance of antibiotic resistance. The purpose of the current investigation was to isolate, identify and explore the antibacterial resistance spectrum of bacterial isolates of bovine respiratory tract pathogens in a large-scale cattle farm.

MATERIALS AND METHODS

Study approval

The study layout was discussed with the farm manager and formal approval was obtained before the start of sampling collection. The samples were collected with the help of on-farm veterinarians and disease diagnosis was also done by a panel discussion of all veterinarians. The institutional approval was obtained from the Animal Ethics Committee of Shihezi University (Approval No. A2022-14403).

Study design and sampling

The study was carried out in the fall of 2022 (November-December) at a large-scale cattle farm that was owned by a large commercial dairy company in China. The farm has Holstein dairy cattle and is located in Xinjiang Uygur Autonomous Region (XUAR) in Northwest China. The farm has fully managed the conditions of intensive dairy farming and all animals were fed silage rather than left to graze. Immature animals (neonatal calves, and one-month-old calves) have separate sections with special care, management and feeding protocols.

Nasopharyngeal swab samples were collected from animals (n=122) suffering from respiratory tract diseases with numerous clinical signs like coughing, sneezing, fever above 40 ºC, difficulty breathing, etc. The animals were restrained properly in standing position and 90% alcohol was applied to nostrils as a disinfectant before sample collection. Sterile transport swabs (Transystem, Copan, Brescia, Italy) were introduced medioventrally in the nasal cavity and after rotating several times were taken out and placed in a transport medium. Within 12h samples were transported to the laboratory and processed for bacteriological investigation.

Bacterial growth

Swabs were inoculated on various general and selective culture media (Oxoid, Ltd., UK) like blood agar, nutrient agar, MacConkey agar, Brilliant Green agar, de-Man-Rogosa Sharpe agar, Eosin Methylene Blue agar and pleuropneumonia-like organism agar, etc. After inoculation, the Petri dishes were incubated aerobically at 37±1ºC for 24-72 hours. For slow-growing organisms like *Mycoplasma* or *Mycobacterium*, the incubation was maintained up to 7 days (Van Driessche *et al*., 2017; Kabir *et al*., 2022). The identification of bacterial isolates was done according to Quinn *et al*. (1992). All analyses were carried out in triplicates and pure cultures were stored for antimicrobial susceptibility testing.

Antibiotic susceptibility testing

The Kirby-Bauer disc diffusion assay was applied to calculate the antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates following the guideline of the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2021). A single loopful of each pure culture was suspended in Mueller Hinton Broth (Oxoid, Ltd., UK) and cultured on Mueller Hinton agar plates after standardizing to 0.5 McFarland standards. The plates were incubated at 37±1ºC for 24h then zones of inhibition were measured. The breakpoints of CLSI for the tested antimicrobials were used to calculate the susceptibility patterns of bacterial isolates.

Statistical analysis

The data was computed in Excel (Microsoft Inc., USA) Spread Sheets. The prevalence of bacterial organisms in respiratory tract samples and their resistance spectrum were calculated in percentages.

RESULTS AND DISCUSSION

In beef and dairy cattle, respiratory diseases result in massive economic losses that demand deep insight into etiological agents like stressors (e.g., transportation, weaning, dietary changes, etc), the interaction between the host and microbiome, intrinsic immunity as well as chronic sub-clinical inflammation in airways that may lead to the occurrence of respiratory diseases. Next-generation sequencing data have shown that there is a great variation in the upper and lower respiratory tract microbiome that potentially convert into pathogens due to stressors (Chai *et al*., 2022). The genera associated with common respiratory

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

tract infections like *Mycoplasma*, *Pasteurella* and *Mannheimia* were observed in the nostrils of healthy cattle (Nicola *et al*., 2017), while *Pasteurella, Mycoplasma, Histophilus,* and *Mannheimia* were reported in the nasopharyngeal samples of both BRD-affected and healthy cattle (Zeineldin *et al*., 2017).

The incidence of *Staph. aureus* was highest (83.6%) in the respiratory tract samples, followed by *Strep. pneumoniae* (80.3%), *Klebsiella pneumoniae* (77.0%). Other bacteria that were found in the respiratory tract were *Mycoplasma bovis* (39.344), *Enterococcus faecalis* (31.148), *Klebsiella pneumoniae* (77.049), *Pasteurella multocida* (49.180), *Bacteroides pyogenes* (36.066), *Enterococcus faecium* (45.902), *Clostridium perfringens* (60.656), *Mycoplasma dispar* (26.230), *Bacillus subtilis* (62.295), *Pseudomonas taetrolens* (42.623), *Mycoplasma alkalescens* (29.508), *Bacillus obstructivus* (24.590), *Strep. pneumoniae* (80.328), *Staph. aureus* (83.607), *Microccus luteus* (60.656). While *Mannheimia haemolytica* (19.6%), followed by *H. somni* (14.7%) were recorded with the least incidences in respiratory tract infection samples of cattle. *H. somni* and *P. multocida* are common pathogens of bovine respiratory tract infections and their incidence is usually expected less than *M. haemolytica* (Anholt *et al*., 2017; Welsh *et al*., 2004). *Bacillus* and *Acinetobacter* are two bacterial genera that are regarded as microbiota of the nasopharynx and lower respiratory tract of feedlot cattle (Zaheer *et al*., 2013; Zeineldin *et al*., 2017). The high incidence of these genera in the respiratory tract infections could reflect microbial seeding of lungs as a result of regurgitation of feedstuffs during rumination and the formation of aerosols during eructation in ruminants. Bacterial species like *Enterococcus faecium, S. pneumoniae, Enterococcus faecalis*, and *Bacillus* spp., had a relatively high abundance in dairy cattle (Klima *et al*., 2019). *S. pneumoniae* is associated with pneumonia in animals and humans (Borsa *et al*., 2019), whereas, *Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis*, and *Bacillus* spp. were regarded as commensal organisms of animal and human gut (Makarov *et al*., 2022).

Studies have shown that respiratory diseases are the 2nd leading cause of death in bovines after gastrointestinal diseases. The prevalence of these diseases was reported 4 to 80% in cattle in recent literature (Pratelli *et al*., 2021; Gaudino *et al*., 2022). The study of Klima *et al*. (2019) dealt with BRD and found that bronchopneumonia was the most prevalent infection among bovine respiratory tract diseases followed by fibrinous bronchopneumonia. Out of 18 observed cases, only one was diagnosed with *Mycoplasma pneumoniae*. During the current investigation, bronchitis followed by bronchopneumonia was recorded as the most common respiratory disease of cattle; while fibrinous bronchopneumonia and *Mycoplasma pneumoniae* were recorded as the least prevalent respiratory diseases of dairy cattle (Table I). *M. haemolytica* was observed as the most prevalent organism in numerous respiratory tract diseases. This finding is in agreement with previous studies that reported that *M. haemolytica* is a common isolate of all types of respiratory tract infections in bovines (Panciera *et al*., 2010; Anholt *et al*., 2017).

Table I. Veterinary diagnosis, number of cases and isolated bacterial species from respiratory tract infections.

Diagnosis	No. of cases	Isolated bacterial species
Chronic bronchopneumonia	14	*Mannheimia haemolytica, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Mycoplasma dispar, Bacillus obstructivus, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*
Bronchopneumonia	22	*M. haemolytica, Mycobacterium bovis, K. pneumoniae, E. faecalis, Pseudomonas taetrolens, B. obstructivus, S. pneumoniae, S. aureus, Micrococcus luteus*
Bronchitis	28	*M. haemolytica, P. multocida, H. somni, E. faecium, C. perfringens, B. subtilis, P. taetrolens, B. obstructivus, S. aureus, M. luteus*
Rhinitis	10	*E. faecalis, E. faecium, B. subtilis, S. aureus, M. luteus*
Fibrinous pneumonia	16	*M. haemolytica, K. pneumoniae, H. somni, M. dispar, P. taetrolens, S. pneumoniae, M. luteus*
Acute suppurative bronchopneumonia	9	*K. pneumoniae, B. pyogenes, C. perfringens, M. alkalescens, S. pneumoniae, S. aureus*
Tracheitis	13	*M. haemolytica, P. multocida, H. somni, E. faecium, B. subtilis, S. aureus, M. luteus*
Fibrinous bronchopneumonia	4	*M. haemolytica, P. multocida, B. pyogenes, E. faecalis, B. obstructivus, S. pneumoniae*
Mycoplasma pneumonia	6	*M. bovis, E. faecium, M. alkalescens, M. luteus*

Table II. Antibacterial resistance percentages of bacterial isolates of respiratory tract infection.

Bacterial isolates (No.)	Antibacterial discs (potency, µg)											
	Gen (10)	Sp (100)	Ch (30)	Cip (5)	Nor (10)	Ery (15)	Lin (2)	Tet (30)	Pen (10)	Cef (30)	Ce (75)	Am (10)
Mannheimia haemolytica (24)	12.5	4.16	29.16	33.33	37.5	37.5	45.83	70.83	75	70.83	58.33	50
Mycoplasma bovis (48)	20.83	20.83	29.16	29.16	41.66	50	50	89.58	91.66	87.5	68.75	50
Enterococcus faecalis (38)	26.31	18.42	31.57	34.21	34.21	42.10	55.26	86.84	86.84	65.78	76.31	63.15
Klebsiella pneumoniae (94)	26.59	21.27	26.59	27.65	29.78	42.55	35.10	57.44	62.76	67.02	61.70	55.31
Pasteurella multocida (60)	26.66	16.66	31.66	40	35	48.33	60	95	100	80	78.33	66.66
Histophilus somni (18)	11.11	11.11	22.22	22.22	27.77	38.88	38.88	66.66	61.11	55.55	55.55	38.88
Bacteroides pyogenes (44)	22.72	15.90	27.27	36.36	36.36	38.63	47.72	75	84.09	63.63	65.90	50
Enterococcus faecium (56)	17.87	8.92	26.78	25	32.14	41.07	53.57	71.42	80.35	78.57	69.64	46.42
Clostridium perfringens (74)	29.72	24.32	25.67	28.37	28.37	43.24	55.40	83.78	86.48	82.43	75.67	54.05
Mycoplasma dispar (32)	40.62	28.12	34.37	46.87	40.62	56.25	62.50	93.75	93.75	93.75	87.50	68.75
Bacillus subtilis (76)	30.26	17.10	25	50	42.10	64.47	67.10	100	98.68	93.42	89.47	67.10
Pseudomonas taetrolens (52)	23.07	15.38	34.61	44.23	30.76	57.69	61.53	80.76	86.53	86.53	76.92	44.23
Mycoplasma alkalescens (36)	36.11	25	36.11	41.66	38.88	72.22	72.22	100	100	97.22	91.66	63.88
Bacillus obstructivus (30)	30	20	33.33	36.66	26.66	60	63.33	90	100	93.33	83.33	50
Streptococcus pneumoniae (98)	26.54	9.19	33.68	31.64	27.56	50	65.31	96.94	98.98	83.68	74.49	50
Staphylococcus aureus (102)	33.33	13.72	41.17	37.25	19.60	56.86	70.58	96.07	95.09	92.15	76.47	57.84
Microccus luteus (74)	25.67	17.56	31.08	43.24	27.02	45.94	68.91	82.43	90.54	89.18	90.54	74.32

Gen, Gentamicin; Sp, Spectinomycin; Ch, Chloramphenicol; Cip, Ciprofloxacin; Nor, Norfloxacin; Ery, Erythromycin; Lin, Lincomycin; Tet, Tetracycline; Pen, Penicillin; Cef, Cefoxitin; Ce, Cefoperazone; Am, amoxicillin.

As shown in Table II, *M. haemolytica* isolates exhibited >70% resistance against tetracycline, penicillin, and cefoxitin. However, these isolates showed the least resistance (4.16%) against spectinomycin. The isolates of *Mycoplasma bovis* were found highly resistant against penicillin (91.6%), while the least resistance (20.8%) was recorded against gentamycin and spectinomycin. The isolates of *Enterococcus faecalis* were found highly (86.8%) resistant against tetracycline and penicillin, followed by cefoperazone (76.3%). *K. pneumoniae* showed >60% resistance against penicillin, cefoxitin and cefoperazone. The isolates of *Pasteurella multocida* exhibited 100% and 95% resistance against penicillin and tetracycline, respectively. The isolates of *H. somni* were found highly resistant against tetracycline (66.6%), while the least resistance (11.1%) was recorded against gentamicin and spectinomycin. The isolates of *Bacteroides pyogenes* exhibited >60% resistance against four antimicrobials i.e., penicillin (84.1%), tetracycline (63.6%), cefoperazone (65.9%) and cefoxitin (63.6%); while least resistance was recorded against spectinomycin (15.9%). *Enterococcus faecium* isolates showed the highest resistance against penicillin (80.3%), followed by cefoxitin (78.5%), tetracycline (71.4%) and cefoperazone (69.6%). *Clostridium perfringens* isolates exhibited >80% resistance against tetracycline, penicillin and cefoxitin; while *Mycoplasma dispar* exhibited 93.7% resistance against these three antimicrobials. The isolates of *Bacillus subtilis* and *Mycoplasma alkalescens* were found fully resistant (100%) against tetracycline; while *Bacillus obstructivus* and *Mycoplasma alkalescens* were observed to 100% resistant against penicillin. *S. pneumoniae* exhibited 96.9% and 98.9% resistance against tetracycline and penicillin, respectively. The isolates of *Staphylococcus aureus* exhibited >90% resistance against tetracycline, penicillin and cefoxitin, while least resistance was recorded against spectinomycin (13.7%). The isolates of *Microccus luteus* showed 90.5% resistance against penicillin and cefoperazone; while 89.1% and 82.4% resistance were exhibited against cefoxitin and tetracycline, respectively.

The study of Anholt *et al.* (2017), reported that *P. multocida, T. pyogenes* and *M. haemolytica* were observed highly resistant to antimicrobials. The majority of the isolates exhibited resistance as high as 90.2%. Timsit *et al.* (2017) reported that *M. haemolytica* and *P. multocida* isolates of BRD exhibited > 70% resistance against oxytetracycline. These reports are in accordance with our current study, as we also recorded more than 70%

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

resistance for *P. multocida,* and *M. haemolytica* against the antibiotics tetracycline, penicillin and cefoxitin. De novo mutation is suspected of the high occurrence of resistance in bacterial isolates, which is consistent with the selection of multidrug-resistant mobile genetic elements or resistant pathogens that have them (DeDonder and Apley, 2015).

Welsh *et al*. (2004) published an 8-year study from 1994-2002 and reported a variable resistance (26-77%) for *M. haemolytica*, *H. somni* and *P. multocida* against tetracycline. Tetracycline was adopted for commercial use in 1978 and was recognized as a drug of choice till the end of the 20th century due to its broad antimicrobial spectrum, high availability and low cost (Gasparrini *et al*., 2020). At present, its' synergistic action and efficacy in localized infections is acceptable, however for systemic infections particularly those caused by Gram-negative organisms efficacy is highly compromised due to significant antimicrobial resistance developed in bacterial pathogens, human and animal commensals and environmental microbes (Chopra and Roberts, 2001). Ribosome protection and efflux are the main resistance mechanisms of bacterial organisms against tetracyclines (Gasparrini *et al*., 2020).

Streptococcus pneumoniae is known to colonize the nasopharynx of humans and animals, however, they were isolated commonly as a pathogenic isolate in fibrinous pneumonia and bronchopneumonia. Due to the high occurrence of *Streptococcus* in the environment and commensal microbiome, and their exposure to over-use of antimicrobials, critical antimicrobial resistance is been reported in animal and human studies (Hayes *et al*., 2020). In the current study *Streptococcus pneumoniae* exhibited ≥ 50% resistance against seven (out of twelve) tested antimicrobials which is also an alarming sign for clinicians to treat clinical cases of respiratory infections.

Mycoplasma is wall-less bacteria that are reported as a part of normal microflora in the respiratory and urogenital tract. They also cause mastitis frequently in dairy animals (Saif *et al*., 2022). In the current study, three species of *Mycoplasma viz*., *M. bovis, M. dispar* and *M. alkalescens* were isolated from respiratory tract samples. All these were observed highly resistant (50-100%) against erythromycin, lincomycin, tetracycline, penicillin, cefoxitin, cefoperazone, and amoxicillin. Being a wall-less bacteria, *Mycoplasma* is intrinsically resistant to cell-wall-targeting antimicrobials. In addition, recent literature has shown that they have established resistance against several other antibiotics like sulfonamide, nalidixic acid, rifampicin, polymixins, trimethoprim and rifampicin (Gautier-Bouchardon, 2018). Moreover, some other antibiotics like macrolides, tetracyclines, lincosamides, tiamulin and spectinomycin were observed as mycoplasmastatic instead of mycoplasmacidal action (Kleven and Anderson, 1971).

CONCLUSION

From the results, it could be concluded that *Staph. aureus*, followed by *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae* were the most prevalent bacterial pathogens in the respiratory tract samples of cattle. Numerous bacterial isolates were observed more than 70% resistant against many antimicrobials. The antimicrobial spectrum results whistle an alarming situation to regulate the non-judicial use of antimicrobials.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to farm manager, staff and colleague veterinarians for their help and support in the sampling process.

Funding

This research was supported by the Xinjiang corps key areas of science and technology project (2021AB012, 2019AB029), Xinjiang corps international science and technology cooperation program (2019BC004) and the XPCC regional innovation guidance program (2018BB036).

IRB approval

The Institutional Review Board (IRB) Approval was granted by the Animal Ethics Committee of Shihezi University (Approval No. A2022-14403).

Ethical statement

Animal handling during sampling was carried out in line with international ethical standard and IRB guidelines.

Statement of conflict of interest

The authors declared no conflict of interest.

REFERENCES

Anholt, R.M., Klima, C., Allan, N., Matheson-Bird, H., Schatz, C., Ajitkumar, P., Otto, S., Peters, D., Schmid, K. and Olson, M., 2017. Antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex in Alberta, Canada. *Front. Vet. Sci.,* **4:** 207. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00207

Bokma, J., Gille, L., De Bleecker, K., Callens, J., Haesebrouck, F., Pardon, B. and Boyen, F., 2020. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal, dairy and beef herds. *Antibiotics*, **9:** 882. https://doi.org/10.3390/

antibiotics9120882

Borsa, N., Di Pasquale, M. and Restrepo, M.I., 2019. Animal models of *Pneumococcal pneumonia*. *Int. J. mol. Sci.,* **20:** 4220. https://doi.org/10.3390/ijms20174220

Carvajal, A.L. and Pérez, P.C., 2020. Epidemiology of respiratory infections. In: *Pediatric respiratory diseases: A comprehensive textbook*, pp. 263-272. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26961-6_28

Catry, B., Dewulf, J., Maes, D., Pardon, B., Callens, B., Vanrobaeys, M., Opsomer, G., de Kruif, A. and Haesebrouck, F., 2016. Effect of antimicrobial consumption and production type on antibacterial resistance in the bovine respiratory and digestive tract. *PLoS One*, **11**: e0146488. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146488

Catry, B., Haesebrouck, F., De Vliegher, S., Feyen, B., Vanrobaeys, M., Opsomer, G., Schwarz, S. and de Kruif, A., 2005. Variability in acquired resistance of Pasteurella and Mannheimia isolates from the nasopharynx of calves with particular reference to different herd types. *Microb. Drug Resist*., **11:** 387–394. https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.387

Chai, J., Capik, S.F., Kegley, B., Richeson, J.T., Powell, J.G. and Zhao, J., 2022. Bovine respiratory microbiota of feedlot cattle and its association with disease. *Vet. Res.*, **53**: 4. https://doi.org/10.1186/s13567-021-01020-x

Chopra, I. and Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.,* **65:** 232–260. https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 31st ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Confer, A.W., 2009. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim. Hlth. Res. Rev.,* **10:** 145–148. https://doi.org/10.1017/S1466252309990193

DeDonder, K.D. and Apley, M.D., 2015. A literature review of antimicrobial resistance in pathogens associated with bovine respiratory disease. *Anim. Hlth. Res. Rev.,* **16**: 125-134.

Dewulf, J., Catry, B., Timmerman, T., Opsomer, G., de Kruif, A. and Maes, D., 2007. Tetracycline-resistance in lactosepositive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: Degree of resistance, multiple resistance and risk factors. *Prev. Vet. Med.,* **78:** 339–351. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.11.001

Donaldson, S.C., Straley, B.A., Hegde, N.V., Sawant, A.A., DebRoy, C. and Jayarao, B.M., 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl. environ. Microbiol*., **72:** 3940–3948. https://doi.org/10.1128/AEM.02770-05

Friis, N.F., 1980. *Mycoplasma dispar* as a causative agent in pneumonia of calves. *Acta Vet. Scand.,* **21**: 34. https://doi.org/10.1186/BF03546898

Gasparrini, A.J., Markley, J.L., Kumar, H., Wang, B., Fang, L., Irum, S., Symister, C.T., Wallace, M., Burnham, C.A.D., Andleeb, S. and Tolia, N.H., 2020. Tetracycline-inactivating enzymes from environmental, human commensal, and pathogenic bacteria cause broad-spectrum tetracycline resistance. *Commun., Biol.,* **3:** 241. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0966-5

Gaudino, M., Nagamine, B., Ducatez, M.F. and Meyer, G., 2022. Understanding the mechanisms of viral and bacterial coinfections in bovine respiratory disease: A comprehensive literature review of experimental evidence. *Vet. Res.*, **53**: 1-25. https://doi.org/10.1186/s13567-022-01086-1

Gautier-Bouchardon, A.V., 2018. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol. Spectrum*, **6:** 6-14. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018

Ghimire, P., Gachhadar, R., Piya, N., Shrestha, K. and Shrestha, K., 2022. Prevalence and factors associated with acute respiratory infection among under-five children in selected tertiary hospitals of Kathmandu Valley. *PLoS One*, **17**: e0265933. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265933

Haley, B.J., Kim, S.W., Salaheen, S., Hovingh, E. and Van Kessel, J.A.S., 2020. Differences in the microbial community and resistome structures of feces from preweaned calves and lactating dairy cows in commercial dairy herds. *Foodborn. Path. Dis.,* **17**: 494-503. https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2768

Hayes, K., O'Halloran, F. and Cotter, L., 2020. A review of antibiotic resistance in group B *Streptococcus*: The story so far. *Crit. Rev. Microbiol.,* **46**: 253-269. https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1758626

Kabir, M.E., Alam, M.J., Hossain, M.M. and Ferdaushi, Z., 2022. Effect of feeding probiotic fermented rice straw-based total mixed ration on production, blood parameters and faecal microbiota of fattening cattle. *J. Anim. Hlth. Prod.*, **10**: 190-197. https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2022/10.2.190.197

Kleven, S.H. and Anderson, D.P., 1971. *In vitro* activity of various antibiotics against *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*., **15:** 551–557. https://doi.org/10.2307/1588731

Klima, C.L., Holman, D.B., Ralston, B.J., Stanford, K., Zaheer, R., Alexander, T.W. and McAllister, T.A., 2019. Lower respiratory tract microbiome and resistome of bovine respiratory disease mortalities. *Microb. Ecol.,* **78**: 446-456. https://doi.org/10.1007/s00248-019-01361-3

Kumar, A., Tikoo, S.K., Malik, P. and Kumar, A.T., 2014. Respiratory diseases of small ruminants. *Vet. Med. Int.*, Article ID: 373642. https://doi.org/10.1155/2014/373642

Makarov, D.A., Ivanova, O.E., Pomazkova, A.V., Egoreva, M.A., Prasolova, O.V., Lenev, S.V., Gergel, M.A., Bukova, N.K. and Karabanov, S.Y., 2022. Antimicrobial resistance of commensal *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from food-producing animals in Russia. *Vet. World*, **15**: 611. https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.611-621

Nicola, I., Cerutti, F., Grego, E., Bertone, I., Gianella, P., D'Angelo, A., Peletto, S. and Bellino, C., 2017. Characterization of the upper and lower respiratory tract microbiota in piedmontese calves. *Microbiome* **5:** 152. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0372-5

Panciera, R.J. and Confer, A.W., 2010. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet. Clin. N. Am. Fd. Anim. Pract.,* **26:** 191–214. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.001

Prat, C., and Lacoma, A., 2016. Bacteria in the respiratory tract how to treat? Or do not treat? *Int. J. Infect. Dis.*, **51**: 113-122. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.09.005

Pratelli, A., Cirone, F., Capozza, P., Trotta, A., Corrente, M., Balestrieri, A. and Buonavoglia, C., 2021. Bovine respiratory disease in beef calves supported long transport stress: An epidemiological study and strategies for control and prevention. *Res. Vet. Sci.*, **135**: 450-455. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.11.002

Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., and Carter, G.R., 1992. *Clinical veterinary microbiology*. Wolfe Publishing. London (UK), pp. 61–65.

Saif, S., Kamboh, A.A., Solangi, G.M., Burriro, R., Baloch, H. and Memon, A.M., 2022. Prevalence of mycoplasma mastitis in buffaloes of Pakistan a pilot study in the centre-west of Balochistan. *J. Anim. Hlth. Prod.,* **10**: 68-72. https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2022/10.1.68.72

Silva, F.L.M. and Bittar, C.M.M., 2019. Thermogenesis and some rearing strategies of dairy calves at low temperature. A review. *J. appl. Anim. Res.*, **47**: 115–122. https://doi.org/10.1080/09712119.2019.1580199

Tikofsky, L.L., Barlow, J.W., Santisteban, C. and Schukken, Y.H., 2003. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microb. Drug Res.*, **9:** 39-45. https://doi.org/10.1089/10766290332254188 3

Timmerman, T., Dewulf, J., Catry, B., Feyen, B., Opsomer, G., de Kruif, A. and Maes, D., 2006. Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Prev. Vet. Med.*, **74**: 251-263. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.10.003

Timsit, E., Christensen, H., Bareille, N., Seegers, H., Bisgaard, M. and Assié, S., 2013. Transmission dynamics of *Mannheimia haemolytica* in newly-received beef bulls at fattening operations. *Vet. Microbiol.,* **161**: 295–304. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.044

Timsit, E., Hallewell, J., Booker, C., Tison, N., Amat, S. and Alexander, T.W., 2017. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida,* and *Histophilus somni* isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. *Vet. Microbiol.,* **208:** 118-125. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.013

Van Driessche, L., Valgaeren, B.R., Gille, L., Boyen, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Deprez, P. and Pardon, B., 2017. A deep nasopharyngeal swab versus nonendoscopic bronchoalveolar lavage for isolation of bacterial pathogens from preweaned calves with respiratory disease. *J. Vet. Int. Med.*, **31:** 946-953. https://doi.org/10.1111/jvim.14668

Welsh, R.D., Dye, L.B., Payton, M.E. and Confer, A.W., 2004. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994–2002. *J. Vet. Diagn. Investig.* **16**: 426–431. https://doi.org/10.1177/104063870401600510

Zaheer, R., Cook, S., Klima, C., Stanford, K., Alexander, T., Topp, E., Read, R. and Mcallister, T., 2013. Effect of subtherapeutic vs. therapeutic administration of macrolides on antimicrobial resistance in *Mannheimia haemolytica* and enterococci isolated from beef cattle. *Front. Microbiol.,* **4**: 133. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00133

Zeineldin, M.M., Lowe, J.F., Grimmer, E.D., Godoy, M.R., Ghanem, M.M., El-Raof, Y.M.A. and Aldridge, B.M., 2017. Relationship between nasopharyngeal and bronchoalveolar microbial communities in clinically healthy feedlot cattle. *BMC Microbiol.*, **17:** 138. https://doi.org/10.1186/s12866-017-1042-2

OPEN ACCESS Journal of Animal Health and Production

Research Article

Preparation of an Inactivated Polyvalent Vaccine Against Common Bacterial Pathogens Causing Bovine Mastitis and Evaluation of its' Immunizing and Therapeutic Potentials

Rafik Soliman[1*], Rafik H. Sayed[2], Hanan Mahmoud[3], Heidy Abo El-Yazeed[1], Marsell Saad[1], Shaimaa Abdelall Elsaady[2], Khalid Sh[3]

[1]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Egypt; [2]Central Laboratory for Evaluation of Veterinary Biologics (CLEVB), Agricultural Research Center (ARC), Ministry of Agriculture, Abbasia, Cairo, Egypt; [3]Animal Health Research Institute (AHRI), Agricultural Research Center (ARC), Ministry of Agriculture, Giza, Egypt.

Abstract | A total of 3608 quarter's milk samples were aseptically collected form 902 Friesian cows, of which 68 (7.54%) suffered from clinical mastitis and 120 (13.3%) proved to suffer from subclinical form of mastitis. Bacteriological examination of the milk samples revealed the isolation of the following pathogens from clinical and subclinical mastitis cases, respectively; *E. coli* (29.41% and 29.2%), *S. aureus* (19.12% and 25%), *Str. agalactiae* (16.2% and 16.6%), *Str. dysgalactiae* (14.7% and 20%), *Str. uberis* (7.3% and 2.5%), *K. pneumoniae* (4.4% and 3.3%), *Str. fecalis* (4.4% and 0%), *Str. pyogenes* (2.9% and 0%) and *Pseudomonas aeruginosa* (1.5% and 3.3%). Among the recovered *E. coli* serotypes, the serotype O111:K58 (B4) was the most prevalent (38.2%). An inactivated polyvalent autogenous mastitis vaccine was prepared from the most encountered bacterial pathogens, namely, *E. coli*, *S. aureus*, *Str. agalactiae and Str. dysgalactiae*. The selected strains for vaccine preparation were inactivated with a predetermined minimal lethal dose of gamma radiation (4krad kGy/min) and the bacterial inactivation was assured using bacteriological examination. Two experiments were done; in experiment No.1, the immunizing efficacy of the prepared vaccine was evaluated in two groups of apparently normal lactating cows (4 cows /group). The first group was unvaccinated and kept as a control group all over the study while the animals in the second group were immunized with the prepared vaccine. Vaccinated cows received two vaccinal doses (5ml) at two week interval. The vaccine was injected subcutaneously in the brachiocephalic muscle. In experiment No. 2, the therapeutic potential of the prepared vaccine was tested in four groups of lactating cows suffering from subclinical mastitis. The first group was left untreated. The second group was treated only with antibiotics (neomycin and penicillin) and the third group was immunized with the prepared vaccine alone. The fourth group was treated simultaneously both with the antibiotics and the prepared vaccine. In both experiments blood and milk samples from cows in all groups were collected before and at 2 weeks intervals post immunization and/or antibiotic treatment. Vaccinated cows in the two experiments did not develop clinical mastitis during the whole observation period that extends up to 20 weeks post treatment. The total immunoglobulin concentration (g/dl) measured four weeks post immunization was significantly higher in the serum and milk whey of immunized cows as compared to the non-immunized cows ($P<0.01$). The highest ELISA titers against *E. coli* (O111), *S. aureus, Str. agalactiae* and *Str. dysgalactiae* were recorded 4 weeks post immunization in the serum and milk whey of immunized cows as compared to the non-immunized group. In cows suffering from subclinical mastitis the vaccination and /or antibiotic treatment induced significant decrease in the somatic cell counts ($P<0.01$). Also, significant reduction of the CFU/ml of the examined milk samples ($P<0.01$) and spontaneous recovery were recorded. No case proceeds to clinical mastitis for an observation period of 20 weeks. These finding showed that the prepared vaccine is potent and able to protect cow against mastitis and able to reduce the disease severity in infected cows.

Keywords | Bovine mastitis, bacterial pathogens, polyvalent inactivated vaccine, Somatic cell count (SCC), immunoglobulins level, ELISA antibody titer

OPEN ACCESS Journal of Animal Health and Production

Received | August 19 2022; **Accepted** | September 20, 2022; **Published** | April 10, 2023
***Correspondence** | Rafik Soliman, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Egypt; **Email:** rafiksoliman108@cu.edu.eg
Citation | Soliman R, Sayed RH, Mahmoud H, El-Yazeed HA, Saad M, Elsaady SA, Sh K (2023). Preparation of an inactivated polyvalent vaccine against common bacterial pathogens causing bovine mastitis and evaluation of its' immunizing and therapeutic potentials. J. Anim. Health Prod. 11(2): 99-108.
DOI | http://dx.doi.org/10.17582/journal.jahp/2023/11.2.99.108
ISSN | 2308-2801

Copyright: 2023 by the authors. Licensee ResearchersLinks Ltd, England, UK.
This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

INTRODUCTION

Bovine mastitis is an economically important disease that affects the dairy farms and the national budget in two ways; direct cost due to per-acute forms of mastitis and loss of cows through premature culling and indirect costs due to reduced milk production and quality, expensive antibiotic therapy, and the serious side effects of the used antibiotics. Excessive use of antibiotics may lead to complete removal of all bacteria, the pathogenic and non-pathogenic, an effect, which has been reported to be associated with a marked increase in severity of acute mastitis (Khaitsa et al., 2000, Schlegelov à et al., 2002);

Mastitis can be caused by a wide range of organisms, including gram-negative and gram-positive bacteria, mycoplasmas, and algae. Many microbial species that are common causes of bovine mastitis, such as *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae, Str. agalactiae* and *S. aureus* also occur as commensals or pathogens of humans, whereas other causative species, such as *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae* subsp. *Dysgalactiae* or *S. chromogenes*, are almost exclusively found in animals (Zadoks, et al., 2011). Environmental streptococci are predominant etiological agents of both subclinical and clinical forms of mastitis (Ferguson et al., 2007; Olde Riekerink et al., 2007). These pathogens are now emerging as one of the most frequent causes of bovine mastitis (Ebrahimi et al., 2008).

The subclinical form of mastitis is one of the most persistent and widely spread disease conditions of importance to milk hygiene and quality among dairy cattle (Mørk et al., 2007; Ogola et al., 2007; Jaime Romero et al., 2018).

Since the introduction of control measures to decrease the prevalence of contagious mastitis pathogens like *S. aureus* and *Str. agalactiae*, little progress has been achieved. The environmental pathogens *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*, and *Enterococcus* spp. (fecal streptococci) are ubiquitous in farms and cause major management difficulties. Although environmental streptococci can be cultured from milk virtually in all dairy herds, the epidemiology and dynamics of environmental streptococcal mastitis and the effects on milk yield and milk quality are poorly documented. According to Ramanauskienė et al. (2008), Fatma et al. (2019) and Gezehagn et al. (2020) the most frequently isolated causative agents of bovine mastitis are streptococci (41.59%) and staphylococci (20.35%)

On the other hand, mastitis is one of the major causes of antibiotic use in dairy cows. There is a variety of antimicrobials that are used for the prevention and treatment of mastitis. Therefore, resistance to antimicrobials is expected. Resistance of mastitis pathogens to antimicrobial agents is another well-documented challenge in dairy industry (Bradley 2007; Päivi Rajala-Schultz et al., 2021).

Several trials for development of bovine mastitis vaccine against the most common contagious and environmental pathogens have been reported (Amorena et al., 1994; Hwang et al., 2000; Dosogne et al., 2002). Also, numerous attempts of vaccination have been made employing live *S. aureus* strains, *Staphylococcus* peptidoglycan, toxoid, or preparation of killed *S. aureus*, Streptococcus species and avirulent *E. coli* strains. Most of these vaccines increased the rate of spontaneous recovery from the infection and lessened its severity but in many cases did not prevent the reoccurrence of new infections (Monaci et al., 2015).

Because the only available control measure of bovine mastitis is the use of expensive antibiotics and commercially available vaccines, the main objective in the present work was to prepare an inactivated polyvalent autogenous vaccine against the most prevalent bacterial pathogens recovered from clinical and subclinical mastitis cases in a dairy farm and to evaluate its immunizing efficacy and therapeutic potential.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Milk samples: A total of 3608 quarter's milk samples were aseptically collected from 902 Friesian cows. The first few streams of milk were discarded and 15 to 20 ml of milk was collected separately from the four quarters of the udder into a sterile screw capped bottle. The collected milk samples were subjected to bacteriological examination.

Also, the somatic cell count and total immunoglobulins level were determined (Olde et al., 2007).

Blood samples: Blood samples were collected from cows in all groups before immunization and at 2 weeks intervals post immunization and/or antibiotic treatments. Serum was separated and kept frozen till examined.

Preparation of milk whey

Five mg of rennin were dissolved in 270 ml of sterile saline and one ml of this solution was added to 10 ml of defatted milk sample. After 30 min incubation at 37°C, the milk was centrifuged at 1000 xg for 20 min and then the supernatant (milk whey) was separated and kept frozen till examined (Frost and Tina, 1988).

Bacteriological examination

A loopful from the sediment of examined milk samples (pre-incubated at 37°C overnight and centrifuged at 3000 xg for 20 minutes) was streaked onto nutrient agar, blood agar and MacConkey agar plates. All plates were incubated at 37°C for 24-72 hrs and examined daily for bacterial growth. Single colonies were picked up and each was plated onto Edwards medium, Mannitol salt agar, EMB and Pseudomonas salt agar and incubated aerobically at 37°C for 24-72 hours for further identification. The isolated bacterial species were fully identified according to Quinn et al. (1994) and David et al. (2001).

Serotyping of the recovered bacterial isolates:

The recovered *E. coli* isolates were serotyped using commercial *Escherichia coli* antisera (Welcome Diagnostic Antisera). The isolated streptococcal species were serotyped using diagnostic reagent range from Oxoid (10 t/ch – P. 9939). These Kits were used for identifying Lancefield groups A, B, C, D and G of isolated streptococci. Dry spot kit (Staphytech plus - Oxoid. DR 100 M), and Latex slide agglutination test was used for identification of staphylococci.

Preparation of an inactivated polyvalent bovine mastitis bacterial vaccine: Bacterial species used: The following bacterial species, which were the most prevalent cause of mastitis in the examined dairy farms, were selected for preparation of an inactivated polyvalent autogenous mastitis vaccine. These include *S. aureus, Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae* and *E. coli* (serotype O111: K58 (B5).

Preparation of the bacterial antigen mass from obtained isolates: Briefly, the used bacterial species were separately inoculated into brain heart infusion broth and incubated at 37°C for 18 hours. The bacterial cells were harvested by centrifugation at 1800 xg for 20 min at 4°C and the supernatant was aseptically discarded. The cell sediment from these bacterial species was washed 3 times with sterile PBS and finally re-suspended in sterile PBS.

In the prepared polyvalent vaccine, the concentration of the bacterial components per vaccine dose was adjusted to 10^{10} CFU/5 ml of *S. aureus,* 4 x10^9 CFU/5 ml of *Str. agalactiae,* 4 x10^9 CFU/5 ml of *Str. dysgalactiae* and 1 x 10^9 CFU/5 ml of *E. coli* serotype O111 using phosphate buffer saline (Hogan et al., 1995; Jose et al., 1997).

Inactivation of the bacterial cells using gamma irradiation: The bacterial mass of each of the 4 bacterial species was subjected to different doses of gamma irradiation trials to determine the minimum lethal dose according to Alur et al. (1998) and Ito (1998). The Minimum lethal dose of ionizing irradiation for the studied pathogens was found to be 4 kGy/min. The inactivated bacterial antigenic mass of the 4 included species in the abovementioned concentrations were mixed and freeze dried. The inactivated bacterial cells were mixed with Montanide, ISA-206 (SEPPIC, France) in a ratio 30:70 with continuous mixing Vincent et al. (2017). The mixture was gently dispersed using homogenizer till a stable oil emulsion with low viscosity was obtained.

Testing for sterility of the prepared vaccine: The vaccine preparations were inoculated on different bacteriological media, incubated for 3 days at 37°C and examined for the presence of any microbial growth (Vincent et al., 2017).

Vaccine efficacy trial

The prepared vaccine was evaluated in 6 groups of lactating cows (4 cows /group):

Experiment No. (1): It includes the first two groups which were clinically apparently normal cows and were used in evaluation of the immunizing efficacy of the prepared vaccine. (Vincent et al., 2017). The first group was kept unvaccinated and served as a control allover the study. The second group was immunized with the prepared vaccine.

Experiment No. (2): The other four groups of cows were included in this experiment. The cows in these 4 groups were suffering from subclinical mastitis and were used for evaluation of the therapeutic potential of the prepared vaccine 2ml /dose (Piepers et al., 2017). The first group (G1) was left untreated (neither antibiotics nor the vaccine). The second group (G2) was treated only with antibiotics (neomycin and penicillin). The third group (G3) was immunized with the prepared vaccine alone. The last group (G4) was treated simultaneously with both antibiotics and the prepared vaccine.

The vaccinated cows received two vaccinal doses at 2 weeks

Table 1: California mastitis test results for determination of the frequency of clinical and subclinical mastitis in dairy cows and percentage of quarters involvement.

Total numbers of cows examined	Clinical condition	Number of affected animals	%*	Total No. of quarters examined	Number of quarters affected	%
902	Animals with clinical mastitis	68	7.54	272	83	30.5
	Animals with subclinical mastitis	120	13.3	480	128	26.67

* Percentage was calculated according to the total number of examined cows.

Table 2: Incidence of pathogenic bacterial species in milk samples of cows with clinical or subclinical mastitis.

Isolated bacterial species	Clinical mastitis		Subclinical mastitis		Total number of isolates	%*
	No.	%	No.	%		
E. coli	20	29.41	35	29.2	55	29.26
S. aureus	13	19.12	30	25	43	22.87
S. dysgalactiae	10	14.7	24	20	34	18.09
S. agalactiae	11	16.2	20	16.6	31	16.49
S. uberis	5	7.3	3	2.5	8	4.26
K. pneumoniae	3	4.4	4	3.3	7	3.72
P. aeruginosa	1	1.5	4	3.3	5	2.65
E. fecalis	3	4.4	0	0	3	1.60
S. pyogenes	2	2.9	0	0	2	1.06
Total	68		120		188	100

*Calculated in relation to the total number of isolates.

Table 3: Types, number and percentage of *E. coli* serotypes recovered from milk samples of cows suffering from clinical and subclinical mastitis.

E. coli serotypes	Animals with clinical mastitis		Animals with subclinical mastitis		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
O111:K58 (B4)	9	45	12	34.3	21	38.2
O127:K63 (B8)	7	35	8	22.8	15	27.3
O 55:K59 (B5)	3	15	7	20.0	10	18.2
O125:K70 (B15)	1	5	5	14.3	6	10.9

Table 4: Total immunoglobulins (gm/dl) in serum and milk whey of apparently healthy cows immunized with the inactivated polyvalent mastitis vaccine.

Dairy cattle groups	Immunoglobulin's concentration (gm/dl) post immunization			
	In serum		In milk whey	
	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks
Control (unvaccinated Cows)	1.48 ± 0.012	1.56 ± 0.034	2.83 ± 0.034	2.88 ± 0.043
Vaccinated cows	1.57 ± 0.036*	1.80 ± 0.049*	3.15 ± 0.018*	3.31 ± 0.030*

* Significant at $P < 0.01$ using t-test as compared with control.

interval and the vaccine was injected subcutaneously in the brachiocephalic muscle.

Blood and milk samples from cows in all groups were collected before and at 2 week interval post immunization and/or antibiotic treatment. Cows in all groups were monitored clinically allover the period of the study.

Statistical analysis

The obtained data were statistically analyzed using t-student test and One-way ANOVA according to Petrie and Watson (1999).

RESULTS

A total of 3608 quarter's milk samples were aseptically

Table 5: ELISA readings (OD) and corresponding titer of specific antibacterial antibodies in serum and milk whey of apparently healthy dairy cows immunized with the inactivated polyvalent bacterial vaccine.

		Reading	Control Non immunized Group (C.O.V.)*	Immunized apparently healthy cows (G I)			
				E. coli	*S. aureus*	*Str. agalactiae*	*Str. dysgalactiae*
Serum samples	2 weeks	OD	0.465	0.584	0.615	0.579	0.499
		Titer	0	1/160	1/160	1/160	1/80
	4 weeks	OD	0.462	0.642	0.662	0.656	0.534
		Titer	0	1/320	1/640	1/320	1/160
Milk whey samples	2 weeks	OD	0.415	0.640	0.618	0.557	0.508
		Titer	0	1/160	1/160	1/160	1/160
	4 weeks	OD	0.411	0.752	0.641	0.595	0.539
		Titer	0	1/640	1/320	1/320	1/320

Results were expressed as OD and representative antibody titer.
* C.O.V. = mean of reading (OD) of control groups + 2 x S.E.

collected form 902 Friesian cows, of which 68 animals (7.54%) suffered clinical mastitis and 120 cows (13.3%) proved to suffer subclinical form of mastitis using California mastitis test (Table 1).

Bacteriological examination of collected milk samples from cows with clinical and subclinical forms of mastitis:

Several bacterial species were recovered from the examined milk samples (Table 2). The most prevalent bacterial species were *E. coli* (29.26%), *S. aureus* (22.87%), *Str. dysgalactiae* (18.09%) and *Str. agalactiae* (16.49%). Several other bacterial species were recorded at a lower rate including *Str. uberis, K. pneumoniae, P. aeruginosa, E. fecalis* and *Str. pyogenes*. Among the isolated *E. coli* isolates, the serotype O111:K58 (B4) was the most prevalent (38.2 %) (Table 3).

Experiment No. (1)
The immunizing efficacy of the prepared polyvalent inactivated mastitis vaccine in apparently healthy lactating cows:
Clinical signs and post vaccination reaction: Cows vaccinated with the prepared polyvalent inactivated mastitis vaccine manifested a mild vaccination reaction at the injection site in a form of swelling that subsides within 4 - 6 days post vaccination. Also, mild rise in rectal temperature (from 0.5 to 1°C) of the injected animals was recorded one hour after the time of injection and remained for 2 days (data not shown). There was no significant reduction of milk yield following immunization with the prepared vaccine. All cows in these groups did not develop clinical mastitis during the whole observation period that extends up to 20 weeks post vaccination.

Immunoglobulin concentration: As shown in Table 4, significant ($P < 0.01$) increase in immunoglobulins concentration (g/dl) was recorded at the 4th week post immunization of the apparently healthy cows, which reached 1.80 ± 0.049 and 3.31 ± 0.030 g/dl in serum and milk whey, respectively, as compared to 1.56 ± 0.034 and to 2.88 ± 0.043 in serum and milk whey from the unvaccinated control cows.

ELISA RESULTS

As shown in Table (5), the highest level of antigen-specific antibodies against the immunogenic components of the prepared vaccine was recorded in serum and milk whey at the 4th week post immunization in cows treated with the vaccine alone. It reached 1/320 against *E. coli* (O_{111}) and *Str. agalactiae*, 1/640 against S. *aureus* and 1/160 for *Str. dysgalactiae*, in serum while it reached 1/640 against *E. coli* and 1/320 against *S. aureus*, *Str. agalactiae* and *Str. dysgalactiae* in milk whey.

Experiment No. (2):
The therapeutic potential of the inactivated polyvalent bacterial mastitis autogenous vaccines in cows suffering from subclinical mastitis:

1. Effect of vaccination on the somatic cell count (SCC): The analysis of SCC in milk samples collected before and 4 weeks post vaccination in cows suffering from subclinical mastitis is shown in Fig. (1). Significant ($P < 0.01$) reduction in the SCC after 4 weeks post vaccination and/or antibiotic treatment was recorded. In the antibiotic treated group the SCC decreased from 35 x 10^4 to 27 x 10^4. In the vaccinated group the SCC decreased from 34 x 10^4 to 24 x 10^4. In the third group that was treated with both the antibiotic and the vaccine, the SCC decreased significantly form 30 x 10^4 to 18 x 10^4.

2. Effect of vaccination on the immunoglobulin concentration: As shown in Fig. (2) and (3), significant ($P < 0.01$) increase of total immunoglobulins in the serum and milk whey was recorded in cows immunized with the prepared vaccine alone. In non-immunized cows and in cows treated with the antibiotics or with the vaccine and antibiotics no significant ($P > 0.05$) increase of total globulins in serum

and milk whey was recorded.

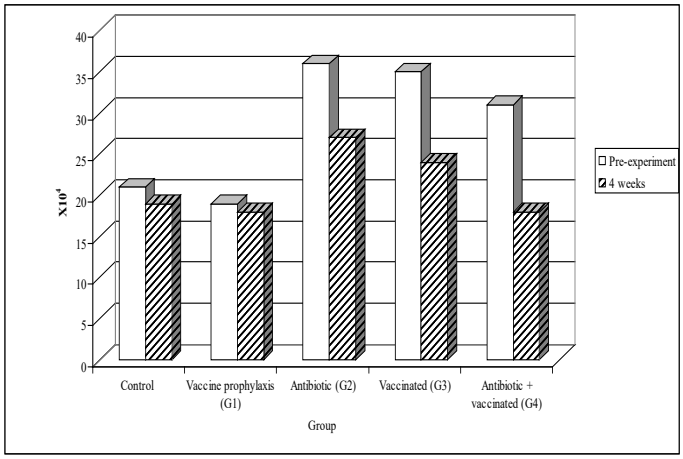


Figure 1: Somatic cell count (SCC)/ml of milk samples in differently treated groups of dairy cattle pre-experiment and at 4 weeks post immunization.

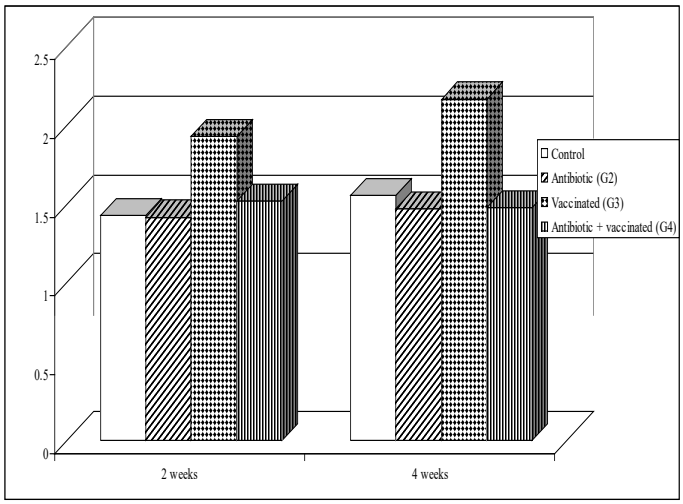


Figure 2: Total immunoglobulins (gm/dl) in serum of differently treated groups of cows with subclinical mastitis.

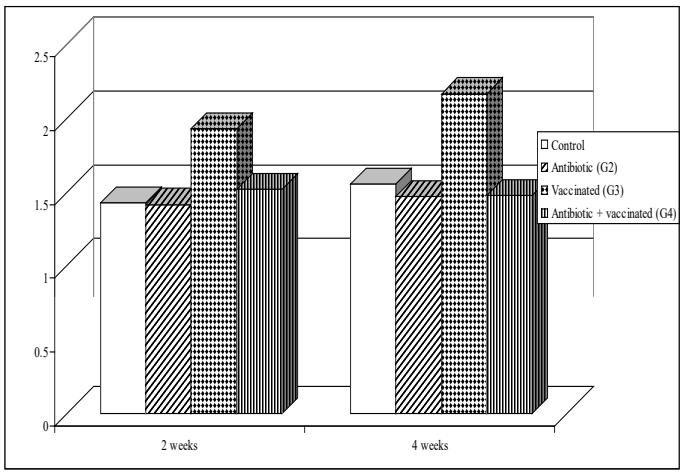


Figure 3: Total immunoglobulins (gm/dl) in milk whey of differently treated groups of cows with subclinical mastitis.

DISCUSSION

Despite the implementation of standard mastitis control programs, mastitis is still economically among the most important diseases of dairy animals. Approaches to enhance the cow's immunity to prevent mastitis and thus minimize use of antibiotics have gained considerable attention. Yet, for a variety of reasons, vaccines developed for the prevention and control of mastitis have achieved only limited success. The multiplicity of pathogens capable of causing mastitis and insufficient knowledge of mammary gland immunology, bacterial virulence factors and mechanisms of pathogenesis are factors that have hindered development of effective mastitis vaccines. Several attempts have been made to develop and evaluate monovalent and polyvalent vaccines against the most prevalent mastitis pathogens like *S. aureus, Str. agalactiae, E. coli* and *Str. uberis*. In general, the commercially available *S. aureus* vaccines although have a limited to moderate ability to prevent new infection, they could enhance the spontaneous cure rates and reducing chronic infections (Piepers et al., 2012; Schukken, et al., 2014).

The first part of the present work was designed to determine the most prevalent bacterial pathogens that underline cases of clinical or subclinical mastitis in cattle. *E. coli*, *S. aureus*, *Str. agalactiae* and *Str. dysgalactiae* were the most common etiological agents recorded. Therefore, a custom designed inactivated polyvalent autogenous vaccine was prepared from these four species and its immunizing and immunotherapeutic potential was determined. The selected bacterial species were grown, mixed and inactivated using gamma radiation. The minimum inactivating irradiation dose was determined and proved to be 4 krad/min (kGy). Similarly, Hammad et al. (1998) reported that an irradiation dose of 4 kGy greatly reduced the microbial count and extend the shelf lifetime of foods. Variation among the intensity of irradiation doses (2-10 kGy) required for microbial inactivation has been reported by several authors (Cho et al., 1986; Leslie, et al., 2008; Fahmida et al., 2013, Wilmar et al., 2019; Eve et al., 2020). The variation of the intensity of irradiation required for inactivation was found to be influenced by several factors, among other, the microbial species involved and the nature of the irradiated material (solution *vs.* dried form) (Andreia et al., 2016; Yifan et al., 2018).

The immunizing and immunotherapeutic potential of the inactivated polyvalent bacterial mastitis autogenous vaccine were determined in a group of cattle in a dairy farm from which the above-mentioned bacterial species were recovered. Determination of the immunizing potential of the prepared vaccine was done in apparently healthy cows, while the immunotherapeutic efficacy was evaluated in cows suffering subclinical mastitis. Slight swelling at the

site of the injection was observed in all vaccinated cows. It continued for 2-6 days post-injection and returned to normal after that. This swelling can be considered as a normal reaction to the injected vaccine. The vaccine was prepared using sterile distilled water free from pyrogenic and toxigenic elements. Compared with the control non-immunized cows, an increase of the rectal temperature (0.5 to 1 °C) was noticed in the injected cows. It persisted for 2 days and became normal after that. The skin reaction and the elevation of temperature, however, can be attributed to the previous sensitization of the injected animals to one or more of the antigenic components of the used vaccine (Dosogne et al., 2002). No significant decrease in milk yield in the days immediately following the immunization was recorded.

The immunizing efficacy of the prepared vaccine was determined using two parameters; first the titer of the specific antibodies developed against microbial components of the vaccine and secondly the level of total immunoglobulins in sera and milk whey of the immunized cows. In the present work, evaluation of the vaccine was limited to its immunizing efficacy only, where the protective efficacy of the vaccine could not be determined. It was impossible for us to run intramammary experimental infection of the immunized cows.

Investigating the effect of immunization of cows with the prepared vaccine on the serum level of total immunoglobulins at 2- and 4-weeks post immunization revealed an increase in the immunoglobulins level in the immunized cows, which reached 1.57 and 1.80 g/dl as compared with 1.48 and 1.56 g/dl in control non-immunized group. Similarly, the level of total immunoglobulins in milk whey of the immunized cows reached to 3.15 and 3.31 g/dl at 2- and 4-weeks post immunization compared to 2.83 and 2.88 g/dl in the control non-immunized cows. Similar result was recorded by Gilman et al. (1991) and Tomita et al. (1998).

Immunization of cows with the prepared inactivated polyvalent bacterial mastitis vaccine variably stimulated the production of specific antibodies against the bacterial components of the vaccine both in the serum and milk whey. Two weeks post immunization a titer of 1/160 of antibodies specific to *E. coli*, *S. aureus*, *Str. agalactiae* and a titer of 1/80 against *Str. dysgalactiae* was measured in sera of the immunized cows. Four weeks post immunization (2 weeks after the booster dose) a significant increase was reported against *S. aureus*, where the antibody titer reached 1/640. Also increase in the anti- *E. coli* and anti- *Str. agalactiae* antibody titer reaching 1/320 was measured. An increase of 1/160 was recorded against *Str. dysgalactiae*. Similar results were reported by several authors using monovalent or polyvalent vaccine (Amorena et al., 1994; Zuhair, 2017). Also, Tomita et al. (1995 and 1998) and Hogan (1999) reported significant increase in IgG antibody titer against *E. coli* in serum of cattle vaccinated with *E. coli* j5 vaccine.

In the milk whey of the immunized cows, the anti-bacterial antibodies detected after two weeks from the immunization reached 1/160- and double-fold increase was measured two weeks following the booster dose. Similar results were reported by Tomita et al. (2000). However, it was observed that the level of anti *E. coli* antibodies was higher in milk whey than the level of anti *S. aureus* antibodies in contrast to what was recorded in the serum of the immunized cattle. This might be attributed to the immunoglobulin classes or subclasses produced against the different bacterial component of the vaccine and perhaps those produced against *E. coli* were of IgG1 isotype that are more secretable in milk compared to other immunoglobulin subclasses that are found in high concentration in blood (Amorena et al.,1994). Tomita et al. (1998) reported also that vaccination of heifers with *S. aureus*, *Str. agalactiae* and *Str. uberis* on days 55 and 45 prior to calving induced significant increase in the blood serum level of IgG1, slight increase in IgG2 content (as a percent of total immunoglobulins) and decrease in IgM content for 1 month after calving.

In spite of the fact that specific antibodies against the bacterial components of the vaccine was detected in blood and milk of immunized cows and none of the vaccinated cows developed clinical mastitis during the whole observation period (20 weeks), no clear statement could be concluded on the protective nature of the prepared vaccine. Evaluation of the protective efficacy required the intramammary experimental infection of cows with the pathogenic bacteria in an experimental model,

In the second experiment the immunotherapeutic potential of the prepared vaccine was evaluated in cows with diagnosed subclinical form of mastitis from which the vaccine components of bacterial species were isolated. All cows in the 3 treated groups did not proceed to clinical mastitis during the whole observation period that extended for 20 weeks. It was observed also that animals treated with the vaccine alone developed significant increase of specific antibodies against the microbial components of the used vaccine. However, in the group treated with the vaccine and antibiotics lower level of antibody response was measured. This might be attributed to possible immunosuppressive effect of the used antibiotics.

Analysis of the result of SCC determined 2 and 4 weeks post treatment revealed significant reduction after 4 weeks from start of the treatment in the three differently treated groups. However, in group that was treated with the anti-

biotic and the vaccine, the reduction of the SCC count was highly significant and the cell number returned to figures similar to those counted in the apparently normal controls. These results are in agreement with those reported by Jose et al. (1997).

Although the success of mastitis vaccine is difficult to define, but its use for therapeutic purpose proved effective as it stops the progress of subclinical cases to proceed to clinical mastitis and also was associated with reduction of the SCC to its normal level. Similar result was recorded by Hogan et al. (1995) who reported rapid recovery and reduction of clinical signs of experimental *E. coli* mastitis through vaccination.

Spontaneous recovery and significant reduction of the microbial CFU /ml of the examined milk samples was recorded in the present work. Leitner et al. (2004) reported that 30% of the *S. aureus* infected cows when vaccinated with a commercial *S. aureus* vaccine remained infection free till the end of 348-day trial, which suggest a curative role of this vaccine.

A recent study made by Athar (2007) demonstrated that locally prepared polyvalent bacterin mastitis vaccines (containing killed *S. aureus, Str. agalactiae,* and *E. coli* with various adjuvants) not only prevented new infections but also cured existing infections of these organisms in dairy buffaloes. Similar observations were made with locally prepared *S. aureus* vaccines (live attenuated vaccine, plain bacterin, dextran sulphate adjuvanted bacterin and oil-adjuvanted bacterin (Ahmed, 2010). Also Hwang et al. (2000) reported the therapeutic efficacy of autogenous *S. aureus* vaccines in Korea. They investigated therapeutic efficacy of an autogenous *S. aureus* toxoid-bacterin in lactating cows suffering from subclinical *S. aureus* mastitis and proved that the autogenous toxoid-bacterin treatment against *S. aureus* subclinical mastitis in lactating cows increase the cure rate of existing infections, reduce their severity and also prevent occurrence of the new infections. It is interesting to note that most *S. aureus* vaccines developed for the prevention of infection act as better curative than preventative agents (Clegg et al., 2021).

CONCLUSION

The obtained results indicated that the prepared polyvalent inactivated autogenous vaccine and the immunization program including subcutaneous injection of two vaccine doses, each of 2ml/animal at 2 weeks interval in the brachiocephalic muscle is efficacious in the reduction of the incidence of intramammary infection due to *S. aureus, Coliforms, Str. agalactia* and *Str. dysgalactiae* in cows. Also, immunization significantly reduces the severity of the symptoms and causes a significant increase in the spontaneous cure rate of cows suffering subclinical mastitis where no case developed acute mastitis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by the Science, Technology and Innovation Funding Authority (STDF) ID 27811.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

NOVELTY STATEMENT

Institutional Animal Care and Use Committee at Central Laboratory for Evaluation of Veterinary Biologics approved the research manuscript and it has been reviewed under our research authority and is fulfilling bioethical standards.

AUTHORS CONTRIBUTION

Experiments were designed by NGS and MSA, and the experiments were performed by HAK, NMA, and MSA. Data analysis was accomplished by NMA. ISY and MSA. The manuscript was written by HAK and MSA.

REFERENCES

Ahmad T, Muhammad G, Yousaf A., Nadeem M, Zafar M.A (2010). Therapeutic Efficacy of Antibiotics and Bacterin-Toxoid in Sub-Clinical Streptococcus Agalactiae Mastitis in Dairy Buffaloes. Revist. Vet. 21 (1): 488-492.

Alur M.D, Kamot A.S., Doke S.N., Nair P.M (1998). "Development of indication process for eradicating salmonella and staphylococcus from pork meat products. J. Food Sci. Technol., 35 (1): 15-20.

Amorena B, Baselga R., Albzin I. (1994). Use of liposome-immunopotentiated expolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. Vaccine., 12 (3): 243-249. https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90201-1

Andreia I. Pimenta, Duarte Guerreiro, Joana Madureira, Fernanda M. A. Margaça, Sandra Cabo Verde (2016). Tracking Human Adenovirus Inactivation by Gamma Radiation under Different Environmental Conditions. Appl Environ Microbiol.; 82 (17): 5166–5173. Pre-published online 2016 Jun 17. Published online 2016 Aug 15. PMCID: PMC4988180. https://doi.org/10.1128/AEM.01229-16

Athar (2007). A preliminary study on the effect of inactivated polyvalent mastitis vaccines on milk quantity and quality in dairy buffaloes. Pakistan Vet. J., 27 (2): 85-91

Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ.(2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in

England and Wales. Vet. Rec.; 24; 160 (8):253-7. https://doi.org/10.1136/vr.160.8.253

Calvinho; L.F.; Tarabla, H.D.; Canavesio, V.R.; Zubriggen, M.A.; Quaino, O. and De-Canavesio, V.R. (1989): Evaluation of a commercial live vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis. Vet. Arg., 6 (56): 380-383.

Cho H.O, M.W. Byun, J.H. Kwon, J.W. Lee, J.S. Yang (1986). Comparison of ethylene oxide (ED) and Irradiation treatment on the sterilization of spices. Korean J. Food Sci. Technol., 18: 283.

Clegg J, Soldaini E, McLoughlin RM, Rittenhouse S, Bagnoli F and Phogat S (2021) Staphylococcus aureus Vaccine Research and Development: The Past, Present and Future, Including Novel Therapeutic Strategies. Front. Immunol. 12:705360. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705360

David E. Kerr, Karen Plaut, A. John Bramley, Christine M. Williamson, Alistair J. Lax, Karen Moore, Kevin D. Wells, Robert J. Wall (2001). Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nat. Biotechnol., 19: 66 – 70. https://doi.org/10.1038/83540

Dosogne H, Meyer E, Sturk A, van Loon J, Massart-Leën AM, Burvenich C. (2002). Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine *Escherichia coli* mastitis. Inflamm Res., 51 (4): 201-5. https://doi.org/10.1007/PL00000293

Ebrahimi A, Nikookhah F, Nikpour S, Majiian F and Gholami M (2008). Isolation of Streptococci from milk samples of normal, acute and subclinical mastitis cows and determination of their antibiotic susceptibility patterns. Pak J. Biol. Sci., 11 (1): 148-50. https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.148.150

Eve V Singleton, Shannon C David, Justin B Davies, Timothy R Hirst, James C Paton, Michael R Beard, Farhid Hemmatzadeh, Mohammed Alsharifi (2020). Sterility of gamma-irradiated pathogens: a new mathematical formula to calculate sterilizing doses. J. Radiat. Res., 61 (6): 886–894. Published online 2020 Sep 15. PMC7674690 https://doi.org/10.1093/jrr/rraa076

Fahmida BA, Kazi TA, S. M. Asaduzzaman, Kazi NH (2013). Effects of Gamma Irradiation on Bacterial Microflora Associated with Human Amniotic Membrane. Biomed. Res. Int., PMC3770025- PMID: 24063009 https://doi.org/10.1155/2013/586561

Fatma M. Abo Zaid, Hassan Y. Abd ElHamed, El-Sagher O. Ahmed, Amal M. Eid, Adel E. A. Mohamed (2019): Frequently Isolated Bacteria From Lactating Cows With Clinical And Subclinical Mastitis In Gharbia Governorate, Egypt. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 22(1): 83-93. https://doi.org/10.21608/auber.2019.99900

Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. (2007): Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to2006. J. Dairy Sci.; 90 (12): 5798-813. https://doi.org/10.3168/jds.2006-903

Frost A.J., Tina M. (1988). The effect on inflammation of the bovine mammary gland of vaccination with a cell wall extract of *Staphylococcus aureus*. J. Vet. Med., B35: 688-694. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1988.tb00545.x

Gezehagn K, Betelihem T, Belege T (2020). Isolation and Identification of Major Pathogenic Bacteria from Clinical Mastitic Cows in Asella Town, Ethiopia. Vet Med Int., 6656755. Published online 2020 Nov 13. https://doi.org/10.1155/2020/6656755, PMCID: PMC7683167, PMID: 33274039.

Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. (eds) (1991). Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics." 8th Ed., Pergamon Press, Member of Maxwell MacMillan Pergamon Publishing Corporation New York, Oxford, Beijing, Frankfurt, Sydney, Toronto.

Hammad A.A.L, T.M. El-Mangy, A.K Mabrouk (1998). Shelf-life extension and improvement of the microbiological quality of fresh sausage with irradiation." 4th Arabic Conference on the Peaceful uses of Atomic Energy.

Hogan J.S., Weiss W.P., Smith K.L., Todhunter D.A., Schoenberger P.S., Sordillo L.M. (1995). Effects of *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. J. Dairy Sci., 78 (2): 285-290. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76636-X

Hogan J.S., Bogacz V.L., Aslam M., Smith K.L. (1999): Efficacy of an *Escherichia Coli* J5 bacterin administered to primigravid heifers. J. Dairy Sci., 82 (5): 939-943. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75312-9

Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ (2011). Economic aspects of mastitis: new developments. N Z Vet. J., 59: 16–23. https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165

Hwang CY, Pak SI, Han HR. (2000). Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with Staphylococcus aureus subclinical mastitis. J. Vet. Med. Sci., 62 (8): 875-80 https://doi.org/10.1292/jvms.62.875.

Ito H. (1998). Irradiation effect of *Escherichia coli* O157:H7 in meats. Shokuhin-Shoska, 33 (1 -2): 29-32. https://doi.org/10.5986/jrafi.33.29

Jaime R, Efraín B, Carlos M (2018). Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms. Front Vet. Sci., 5: 273. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00273, PMCID: PMC6277785 PMID: 30542654.

Jose A. Giraudo, Horacio, Alberto, Giraudo (1997). Field trials of vaccine against bovine mastitis. J. Dairy Sci., 80: 845-853. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76006-5

Khaitsa ML, Wittum TE, Smith KL, Henderson JL and Hoblet KH (2000). Herd characteristics and management practices associated with bulk-tank somatic cell counts in herds in official Dairy Herd Improvement Association programs in Ohio. Am J Vet Res., 61 (9): 1092-8. https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.1092

Leitner, U. Merin, N. Silanikove (2004). Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Goats G. American Dairy Science Association, J. Dairy Sci., 87: 1719–1726 https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73325-1

Leslie A. Dauphin, Bruce R. Newton, Max V. Rasmussen, Richard F. Meyer, Michael D. Bowen (2008). Gamma Irradiation Can Be Used To Inactivate *Bacillus anthracis* Spores without Compromising the Sensitivity of Diagnostic Assays Appl. Environ. Microbiol., 74 (14): 4427–4433. Published online 2008 May 30. https://doi.org/10.1128/AEM.00557-08

Monaco C., Nanchahal J., Taylor P., Feldmann M. (2015). Anti-TNF therapy: past, present and future. Int. Immunol. 27, 55–62. https://doi.org/10.1093/intimm/dxu102

Mørk T, Waage S, Tollersrud T, Kvitle B, Sviland S (2007). Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. Acta Vet. Scand., 24; 49:23. https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-23

Ogola H, Shitandi A, Nanua J (2007). Effect of mastitis on raw milk compositional quality. J Vet Sci., 8 (3):237-42. https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.3.237

Olde Riekerink RG, Barkema HW, Stryhn H. (2007). The effect of season on somatic cell count and the incidence of

clinical mastitis. J. Dairy Sci., 90 (4):1704-15. https://doi.org/10.3168/jds.2006-567

Päivi Rajala-Schultz, Ane N, Tariq H, Karin PW (2021). Prudent Use of Antibiotics in Dairy Cows: The Nordic Approach to Udder health. Front. Vet. Sci., volume 8, 1-7. Sec. Vet. Epidemiol. Econ. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.623998.

Petrie A., Watson P. (1999). Statistics for Veterinary and Animal Science." 1st Ed., pp. 90-99, The Blackwell Science Ltd, United Kingdom.

Piepers S., K. Deberdt, A. DeVisscher, J. Verbeke, S. De Vliegher (2012). Immunological response to an experimental intramammary inoculation with a killed *Staphylococcus aureus* strain in vaccinated and non-vaccinated lactating dairy cows. World Buiatrics Congress. June 5, Lisbon, Portugal. Pages 8-11. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-742-4_68

Piepers S., A. Prenafeta, J. Verbeke, A. De Visscher, Ricard March, S. De Vliegher (2016). Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine J. Dairy Sci. 100:769–782 https://doi.org/10.3168/jds.2016-11269 © American Dairy Science Association®,

Quinn P. J., Carter M. E., Markey,B. K., Carter G. R. (1994). Clinical veterinary microbiology." Mosby year book Europe limited, lynton House, London, PP. 109-126.

Ramanauskienė J., Sederevičius A., Aniulis E., Rudejevienė J., Želvytė R., Monkevičienė I., Laugalis J., Kabašinskienė A., Makauskas S. and Savickis S. Karvių klinikinio mastito gydymo efektyvumo tyrimai (2008): Vet Med Zoot.. T. 41 (63). P. 80–85.

Schlegelová J, Babák V, Klímová E, Lukásová J, Navrátilová P, Sustácková A, Sedivá I, and Rysánek D. (2002): Prevalence of and resistance to anti-microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 49 (5): 216-25. https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00520.x

Schukken Y.H., V. Bronzo, C. Locatelli, C. Pollera, N. Rota, A. Casula, F. Testa, L. Scaccabarozzi, R. March, D. Zalduendo, R. Guix, P. Moroni. (2014). Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. J. Dairy Sci. 97: 5250-5264. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8008

Tomita G.M., Todhunter D.A., Hogan J.S., Smith K.L. (1995). Immunization of dairy cows with an *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide vaccine. J. Dairy Sci., 78 (10): 2178-2185 https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76845-X.

Tomita G.M., Nickerson S.C., Owens W.E., Wren B. (1998). "Influence of route of vaccine administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. J. Dairy Sci., 81 (8): 2159-64. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75793-5

Tomita G.M., Ray C.H., Nickerson S.C., Owens W.E., Gallo G.F. (2000). A comparison of two commercially available *Escherichia coli* J5 vaccines against *E. coli* intramammary challenge. J. Dairy Sci., 83 (10): 2276-2281. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75112-5

Vincent H, Christophe G, Guillaume T, Maryline R, Laurine F, Christian T, Florence B. Gilbert, Edouard G, Céline B, Christophe S, David G. E. Smith, Pierre G, Gilles F, Pascal R (2017). Local immunization impacts the response of dairy cows to *Escherichia coli* mastitis. Scient. Rep. volume 7, Article number: 3441 https://doi.org/10.1038/s41598-017-03724-7

Wilmar C, Julius B, Jochen B, Lena H, Norbert R, Laura P, Dominik S, Kerstin S, Guillermo Martinez-de-Tejada, Klaus B, Thomas G (2019). Inactivation of Bacteria by γ-Irradiation to Investigate the Interaction with Antimicrobial Peptides. Biophys. J., 117 (10): 1805–1819. Published online 2019 Oct 18. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.012

Yifan Z, Ralf M, Sophia T, Barbora D, Georgios A, Nicolas M, David D, Alexander M (2018). *Geobacillus* and *Bacillus* Spore Inactivation by Low Energy Electron Beam Technology: Resistance and Influencing Factors Front Microbiol., 9: 2720. Published online 2018 Nov 23. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02720

Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, and Schukken YH.(2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia., 16 (4):357-72 https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y.

Zuhair BI (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. Vet. World., 10 (9): 1057–1062. Published online 2017 Sep 12. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1057-1062

animals

MDPI

Article

Assessment of Luteal Function Using Rectal Palpation, B-Mode Ultrasonography, and Progesterone Determination to Improve Recipient Selection in Embryo Transfer Programs

Uxía Yáñez [1], Mónica Barrio [2], Ismael Fernández [2], Juan J. Becerra [1], Pedro G. Herradón [1], Ana I. Peña [1] and Luis A. Quintela [1,*]

[1] Unit of Reproduction and Obstetrics, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Campus Terra, Universidade de Santiago de Compostela, Avda. Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain; uxia.yanez.ramil@usc.es (U.Y.); juanjose.becerra@usc.es (J.J.B.); garcia.herradon@usc.es (P.G.H.); ana.pena@usc.es (A.I.P.)

[2] Xénese E.T.E., Barreiros, Sedes, 15596 Narón, Spain; monica@xenese-ete.com (M.B.); ismael@xenese-ete.com (I.F.)

* Correspondence: luisangel.quintela@usc.es

Simple Summary: The selection of recipients plays a key role in embryo transfer (ET) programs. Besides evaluating the animal's health and reproductive status, this selection is usually performed by assessing luteal function. Rectal palpation (RP), ultrasonography (US), and progesterone determination (P4) are the main techniques used in routine practice. Consequently, we aimed to confirm if US and P4 offer any advantages compared with RP with regard to selecting recipients with higher odds of maintaining pregnancy, and to determine if the CL volume within the ovary (%CLOV) and the presence of a cavity are good predictors of ET outcome. Our results showed that both RP and US are useful techniques to select recipients. Regarding pregnancy rate, we only observed a statistically significant effect for the veterinarian who performed the ET. Therefore, none of the CL measurements studied were good indicators for pregnancy rates after ET procedure.

check for updates

Citation: Yáñez, U.; Barrio, M.; Fernández, I.; Becerra, J.J.; Herradón, P.G.; Peña, A.I.; Quintela, L.A. Assessment of Luteal Function Using Rectal Palpation, B-Mode Ultrasonography, and Progesterone Determination to Improve Recipient Selection in Embryo Transfer Programs. *Animals* **2023**, *13*, 2865. https://doi.org/10.3390/ani13182865

Academic Editors: Olimpia Barbato and Vittoria Lucia Barile

Received: 4 July 2023
Revised: 6 September 2023
Accepted: 7 September 2023
Published: 9 September 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Proper selection of recipients determines the success of embryo transfer (ET) programs. Therefore, the objectives of this study were to assess the accuracy of rectal palpation (RP) in selecting recipients according to the size and firmness of their corpus luteum (CL) compared to ultrasonography (US) and progesterone determination (P4); to check if US or P4 provide additional information to RP with regard to selecting animals with higher odds of maintaining the pregnancy; and to verify the reliability of the presence of a cavity and the volume of the CL within the ovary (%CLOV) as predictors of the ET outcome. In Experiment 1, measurements for the largest and minor diameter (LADCL and MIDCL), CL area, and P4 at ET day were collected, as well as the RP score, in 94 heifers. In Experiment 2, measurements for the LADCL, MIDCL, CL volume, %CLOV, and presence of a cavity were collected, as well as data about the procedure and metabolic markers, in 108 heifers. No differences were found in Experiment 1, whereas in Experiment 2, just a tendency was observed for the variable of veterinarian. Consequently, these results suggest that RP and US are useful methods to select recipients with, that US and P4 do not offer additional data to use to select animals with higher odds of maintaining pregnancy, and that neither %CLOV nor cavitary CL were good indicators for pregnancy rates.

Keywords: embryo transfer; corpus luteum; ultrasound; rectal palpation; progesterone; heifer

1. Introduction

Embryo transfer (ET) is the world's most widespread technique for rapidly multiplying elite genetics [1]. Although ET practices for cattle have been commercially used for decades, improvements in technique and pregnancy results have remained a topic of research [2,3].

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

In this regard, it has been stated that despite the many advances that have made ET a routine procedure in many agricultural settings, the process has still not been perfected [4].

It is important to note that the success of any ET program is influenced by several factors, among which the proper selection of recipients plays a crucial role [5,6]. Criteria like parity, age, body condition score (BCS), reproductive status, and health status are used to categorize both beef and dairy recipients [1,6]. On the one hand, there are several advantages to using heifers as recipients. The fact that possible reproductive issues derived from previous pregnancies are avoided, along with a small and easy to manipulate uterus, facilitate the achievement of good pregnancy rates [1,6]. However, heifers are more prone to suffer dystocia at calving [1]. On the other hand, the transcervical ET is easier to perform in cows that have already calved, with acceptable pregnancy rates and greater ease of calving. Nevertheless, the fertility of these animals is influenced by other factors such as negative energy balance, high milk production, and postpartum pathologies [7]. In all cases, it is essential to take all possible sanitary measures to avoid any type of embryo loss or abortion and to establish a vaccination program against potential diseases present in the stable or in the area [1].

Under these conditions, having an adequate number of recipients suitable for transfer is a limiting factor for the development of the technique, especially in small farms. It is therefore necessary to maximize the use of these recipients so that they can become pregnant in the shortest possible time. When starting the selection process of recipients, their ability to show estrus within a desired period should be taken into account either by detection of natural estrus or by the use of ovulation synchronization methods for fixed-time ET [8]. Another important key point to consider is the ability of the recipients to ovulate and form a functional corpus luteum (CL) able to produce progesterone for a sufficient time and in a sufficient quantity to act on the progesterone receptors of the uterus, modifying the pattern of uterine secretions necessary to favor the development and maintenance of the embryo [5,9–11]. Only during the luteal stage of the estrus cycle does the uterine microenvironment provide an adequate medium for the embryos to develop. As a result, the harmonization of the physiological state of the donor and the recipient in ET procedures lays the foundations for its success [12].

It should be noted that the measurement of plasma progesterone concentration on the day of ET could be used to identify either active or inactive CL. However, this procedure is costly and time-consuming [8]. In farms, the functionality of the CL has been traditionally assessed by rectal palpation (RP), evaluating both the size and the integrity of the CL [13]. In addition, B-mode ultrasonography has also been used for this purpose, considering CL measurements, such as CL area, as indicators of function [14]. More recently, color Doppler ultrasonography has been studied as a novel approach to CL functionality assessment, showing promising results [5,15,16]. However, in daily practice, most veterinarians use either RP or B-mode ultrasonography, as Doppler ultrasonography is not available in most ultrasound equipment yet.

It has been stated that selecting recipients based on either progesterone levels or CL function is likely to increase the probability of implantation and pregnancy following ET [17]. Therefore, selecting the recipients according to the measurements of the CL may be an efficient strategy to improve ET outcomes. Several characteristics of the CL have been studied in order to determine CL function and to predict pregnancy rates in recipients, such as CL consistency, diameter, area, volume, presence of cavity, echotexture, and blood flow [5,8,11,13,18]. However, controversial results have been reported regarding which of those would be the best indicators or if it is possible to predict pregnancy rates based on CL characteristics.

Moreover, although it has been reported that progesterone production and response to prostaglandin treatments do not differ between cavitary and compact CL [19,20], disparate results have been obtained regarding pregnancy outcome. Some authors described a decreased pregnancy-maintaining ability of cows with a cavitary CL [21], while others

considered a cavitary CL as a possible indicator of higher potential of the recipient in maintaining the pregnancy [18].

Consequently, additional research is needed to verify the effect of a cavitary CL on the conservation of pregnancy after ET. Moreover, to our knowledge, the possible influence of the CL volume in relation to total ovarian volume (%CLOV) on the selection of recipients and pregnancy rates has not been evaluated. Therefore, two experiments were carried out to achieve the aims of this study. In Experiment 1, the objective was to assess the accuracy of RP with regard to selecting recipients according to the size and firmness of the CL compared to B-mode ultrasonography (US) and serum progesterone determination (P4); a second objective was to check if US or P4 provide additional information to RP in order to select animals with higher odds of maintaining the pregnancy. In Experiment 2, the objective was to check the reliability of the presence of a cavity and the %CLOV as predictors of the ET outcome.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

In Experiment 1, 94 15–17-month-old Holstein heifers were included in the study. Animals belonged to 7 farms from Galicia (Spain) and were housed in free-stall facilities under intensive management. In Experiment 2, 108 14–18-month-old Holstein heifers were used. Animals belonged to 2 breeding centers from Galicia (Spain) and were housed in free-stall facilities under intensive management. In both experiments, heifers were selected as recipients according to their age (>13 months), health status (negative to IBR, BVD, and *Neospora*), reproductive health, and BCS (2.75–3.5 on a scale of 1–5). The transferred embryos were obtained in vivo from Holstein cows with high genetic value and all of them were scored as Quality 1 according to IETS classification [22]. The non-surgical procedure for ET was used, following the same steps as in regular practice. Embryos were transferred fresh after evaluation, or thawed after cryopreservation, following the adequate protocol (see ET procedure below). In Experiment 1, only frozen embryos using the cryopreservant Ethylene Glycol were used, while in Experiment 2, fresh and frozen embryos with Ethylene Glycol and Glycerol were utilized. Both experiments were conducted in accordance with the European and Spanish Regulations for the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU, RD 53/2013).

2.2. Synchronization Protocol

In Experiment 1, two different synchronization protocols were used (Figure 1), ensuring that the same protocol was applied on the same farm and set of heifers. The first protocol consisted of the introduction of an intravaginal progesterone release device 1.55 g (PRID® DELTA, Ceva Santé Animale, Libourne, France) and the administration of 50 µg of the GnRH analogue lecirelin (Dalmarelin, Fatro Ibérica, Barcelona, Spain) on Day 0, removal of the progesterone device and administration of 0.15 mg of D-cloprostenol (Dalmazin, Fatro Ibérica, Barcelona, Spain) on Day 7, administration of 50 µg of lecirelin on Day 9, and heat detection thereafter. The second protocol consisted of the introduction of the intravaginal progesterone release device on Day 0, removal of the device and administration of D-cloprostenol on Day 7, and heat detection from Day 9 onwards. The possible influence of these synchronization protocols on the percentage of recipients fit for the ET or on the subsequent pregnancy rates has been previously studied by our group (data not published) and it was observed that both protocols were effective for heat synchronization in heifers.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

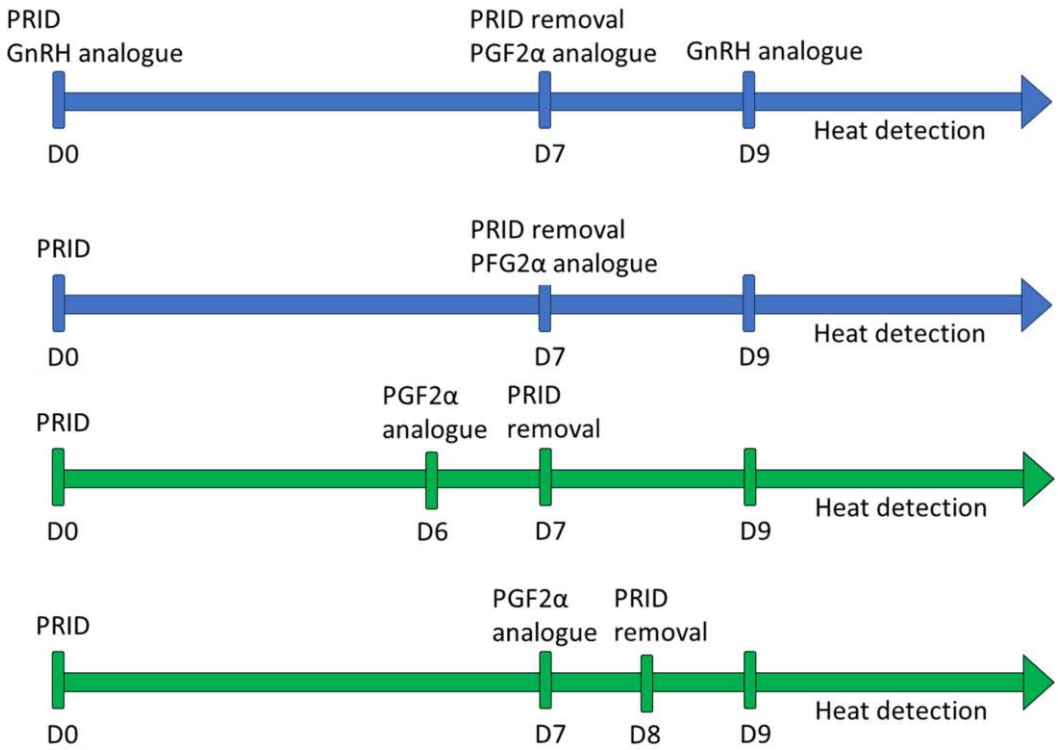


Figure 1. Schemes of the different synchronization protocols followed in Experiment 1 (blue) and Experiment 2 (green) to synchronize 94 and 108 Holstein heifers, respectively, as recipients for embryo transfer.

In Experiment 2, two different synchronization protocols were used as well (Figure 1). The first protocol consisted of the following steps: Day 0, an intravaginal progesterone release device 1.55 g (PRID® DELTA, Ceva Santé Animale, Libourne, France) was introduced; Day 6, 0.15 mg of D-cloprostenol was administered; the progesterone device was removed on Day 7; and heat detection was performed from Day 9 onwards (PRID7PG6). The second protocol was almost identical, the only differences being that the D-cloprostenol was administered on Day 7, and the progesterone device was removed on Day 8 (PRID8PG7).

2.3. Recipient Selection

In Experiment 1, heifers were explored by rectal palpation and ultrasonography seven days after the onset of heat. Rectal palpation was performed by two experienced veterinarians with the same selection criteria. The evaluation method was based on the one described by Zemjanis in 1970 [23], which classifies CL according to their size, texture, and firmness (Table 1). Heifers without a luteal structure were classified as "absence of CL".

Table 1. Corpus luteum (CL) classification followed to select 94 Holstein heifers as recipients for embryo transfer procedure. Rectal palpation was performed seven days after the onset of heat, following a heat synchronization protocol (Adapted from Zemjanis, 1970 [23]).

CL Classification	Days of Cycle	Description
Absence of corpus luteum	1–2	Collapsed follicle
Hemorrhagic body 1 (HB1)	2–3	Soft, friable, developing CL, <1 cm
Hemorrhagic body 2 (HB2)	3–5	Soft CL, 1–2 cm
Hemorrhagic body 3 (HB3)	6–7	Consistent CL, >2 cm, still mobile, with palpable crown
Corpus luteum 3 (CL3)	8–17	Big and firm CL, crown integrated into the ovary
Corpus luteum 2 (CL2)	18–20	Hard CL, under regression
Corpus luteum 1 (CL1)	20–21	Very hard CL, <1 cm

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Heifers with a hemorrhagic body classified as HB3 were selected and the side of the HB was marked to allow a quicker and easier transfer once the embryo was thawed. Next, an ultrasonography scan of the ovary was performed. A PieMedical Tringa Scan (Esaote, Genoa, Italy), equipped with a 5.0 MHz linear-array transducer, was used. Measurements for the largest diameter of the CL (LADCL), minor diameter of the CL (MIDCL), and CL area (CLA) were obtained.

In Experiment 2, heifers were explored by rectal palpation and ultrasonography on day 7 after the onset of heat. An HS-1500 Scan (Honda Electronics Co., Ltd., Aichi, Japan), equipped with a 7.5 MHz linear-array transducer, was used. Heifers with a CL > 18 mm diameter were included in the study (n = 97). For each selected heifer, a detailed scanning of the ovary was performed, and measurements for LADCL, MIDCL, largest diameter of the ovary (LADOV), and minor diameter of the ovary (MIDOV) were obtained. The volume of the CL (VOLCL) was calculated assuming a perfect sphere, using the formula:

$$V = 4/3\pi r^3$$

When a cavity was present, the volume of the cavity was calculated using the same formula and subtracted from the total volume of the CL. Additionally, the volume of the ovary (VOLOV) was calculated according to the formula:

$$V = \frac{4}{3}\pi abc$$

where a, b, and c correspond to height, width, and length of the ovary, respectively. Finally, the percentage of the ovary that corresponds to the CL (%CLOV) was calculated.

2.4. Blood Sample Collection and Analysis

Upon completion of the recipients' examination, blood samples were collected from the coccygeal vein using vacuum tubes without anticoagulants in both experiments. Samples were kept in refrigeration for a maximum of 6 h, and serum was separated after centrifugation at 1500× *g* for 30 min into 0.5 mL aliquots and was stored at −18 °C until analysis.

Serum progesterone (P4) concentrations were measured in both experiments with a commercial progesterone ELISA kit (Progesterone ELISA EIA-1561, DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany) following the manufacturer's instructions. The determinations were performed twice for each sample, and the mean value between both measurements was used. The detection limit for P4 ranged from 0 to 40 ng/mL, with an analytical sensitivity of 0.045 ng/mL. Optical densities were measured in a microplate reader (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

In Experiment 2, the concentrations of additional biochemical indicators were assessed. All analyses were performed using a digital photometer (Selecta MD200, Barcelona, Spain), except for total protein analysis, for which a portable refractometer was used (J.P. SELECTA S.A., Abrera, Barcelona, Spain). Glucose, total cholesterol, triglyceride, and albumin concentration were determined by a colorimetric endpoint method (BioSystems S.A., Barcelona, Spain). Hepatic enzymes alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), and gamma-glutamyltransferase (GGT) were determined by using BioSystems reagents. Urea was also analyzed through a colorimetric enzymatic method with Spinreact reagents (Spinreact, S.A.U., Sant Esteve de Bas, Spain). Non-esterified fatty acids (NEFA) and β-hydroxybutyrate acid (BHBA) were determined by kinetic enzymatic kits (Randox Laboratories Ltd., Antrim, UK).

2.5. Embryo Transfer Procedure

Once the recipients were selected, they were prepared for the transfer following the non-surgical procedure in both experiments. The ET was performed by one experienced veterinarian in Experiment 1, while in Experiment 2, the procedure was carried out by

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

2 different, experienced veterinarians. First, animals were sedated using 6–10 mg xylazine (Rompun 20 mg/mL, Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Germany). Then, epidural administration of 80 mg of procaine (Pronestesic 40 mg/mL, Fatro Iberica, Barcelona, Spain) was performed to immobilize cows as much as possible to avoid injuries in the endometrium during the transfer. Additionally, in Experiment 2, 500 mg of the anti-inflammatory agent flunixin meglumine (Finadyne 50 mg/mL, Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L., Kenilworth, NJ, USA) was administered intramuscularly (n = 9) to avoid the release of endogen prostaglandins as a consequence of the transfer. Finally, the entire perivulvar area was wiped with paper to avoid introducing contamination into the vagina and uterus.

After embryo collection/thawing (Table S1), the straw was placed into a Cassou rod of 3 mm diameter (Minitub Iberica S.L., Tarragona, Spain). The rod was covered with a sterile sheath with steel tip and side holes, and it was protected with a plastic sanitary sleeve (Chemise Sanitaire, IMV Technologies, L'Aigle, France). Once the rod was introduced in the cervix, the sanitary sleeve was retracted and the rod was passed into the uterus halfway into the uterine horn ipsilateral to the ovary with the CL, where the embryo was smoothly placed. Pregnancy diagnoses were performed at 30–40 days after embryo transfer using ultrasonography, and recipient cows were classified as pregnant or not pregnant.

2.6. Statistical Analysis

In Experiment 1, serum P4 levels, LADCL, MIDCL, and CLA were considered continuous variables, and the rectal palpation classification of the CL (RPCL) was considered a categorical variable, classified as shown in Table 1. First, a Pearson's correlation analysis was performed including serum P4 levels, LADCL, MIDCL, and CLA. To compare RPCL, a Oneway ANOVA test was performed using the general linear model (GLM) tool, including serum P4, LADCL, MIDCL, and CLA as dependent variables, and the RPCL as factor. The HSD Tukey test was used to check the significant differences between ovarian structures, and homogeneity of variances was checked using Levene's test.

Additionally, the influence of rectal palpation, ultrasonography, and progesterone measurements on the ET outcome was tested. A Oneway ANOVA test was performed using the GLM tool, including pregnancy as independent variable and serum P4, LADCL, MIDCL, and CLA as dependent variables.

In Experiment 2, the following were considered as continuous variables: LADCL, MIDCL, LADOV, MIDOV, VOLCL, %CLOV, serum P4, BCS, glucose, total cholesterol, triglyceride, albumin, total protein, ALAT, ASAT, GGT, urea, BHB, and NEFA. As for the categorical variables, they were considered as follows: pregnant (YES/NO), CL cavity (YES/NO), flunixin meglumine administration (YES/NO), type of embryo (Ethylene glycol, glycerol, fresh), veterinary who performed the transfer (n°1/n°2), and synchronization protocol (PRID7PG6/PRID8PG7). We determined the relative contribution of each factor to the probability of pregnancy using a backward stepwise binary logistic regression. We included the pregnancy outcome as dependent variable and the remaining variables as independent factors.

All analyses were conducted in SPSS version 28.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1

Of the 94 recipients evaluated for the ET, 51 were selected according to the rectal palpation criteria, i.e., presence of a HB3 in the ovaries. Data from the 94 animals were used to assess the correlation between the different techniques used to evaluate the CL. On the other hand, of the 51 animals selected for the transfer, 2 heifers were excluded due to data loss. Therefore, data from 49 selected heifers were used to test the influence of the measurements obtained on the ET outcome. The pregnancy rate in this experiment was 44.9%.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Results for the Pearson's correlation analysis showed that there is a positive, statistically significant correlation between serum P4 concentration, CLA, and MIDCL (Table 2).

Table 2. Results for the Pearson's correlation analysis, including 94 Holstein heifers, for the variables serum progesterone concentration (serum P4), corpus luteum area (CLA), largest diameter of the CL (LADCL), and minor diameter of the CL (MIDCL).

	Serum P4	CLA	LADCL	MIDCL
Serum P4	1	0.335 **	0.189	0.368 **
CLA	-	1	0.758 **	0.799 **
LADCL	-	-	1	0.511 **
MIDCL	-	-	-	1

** $p \leq 0.01$.

Regarding RPCL, no observations were made for HB1 and CL1, i.e., none of the animals included in the study presented any of these structures in their ovaries. Results for the Oneway ANOVA are displayed in Table 3.

Table 3. Results for the Oneway ANOVA test, including 94 Holstein heifers, for the variables serum progesterone concentration (Serum P4), corpus luteum area (CLA), largest diameter of the CL (LADCL), and minor diameter of the CL (MIDCL) according to the classification of the luteal structure present in the ovary, evaluated via rectal palpation (Zemjanis, 1970 [23]): hemorrhagic body 2 (HB2), hemorrhagic body 3 (HB3), corpus luteum 3 (CL3), and corpus luteum 2 (CL2).

	n	Serum P4 (ng/mL)	CLA (cm^2)	LADCL (cm)	MIDCL (cm)
Absent CL	7	2.17 ± 1.99^{a}	-	-	-
HB2	14	7.67 ± 5.70^{ab}	3.04 ± 1.10^{a}	2.39 ± 0.46^{a}	1.53 ± 0.29^{a}
HB3	51	7.81 ± 4.37^{b}	4.16 ± 1.02^{b}	2.81 ± 0.43^{b}	1.90 ± 0.32^{b}
CL3	15	7.52 ± 6.14^{ab}	3.49 ± 1.01^{ab}	2.66 ± 0.67^{ab}	1.72 ± 0.36^{ab}
CL2	7	3.84 ± 2.98^{ab}	2.54 ± 1.03^{a}	2.27 ± 0.51^{ab}	1.35 ± 0.29^{a}

[a,b] Different letters indicate statistically significant differences in the same column.

Concerning the influence on pregnancy rates, the Oneway ANOVA test showed no statistically significant differences between pregnant and non-pregnant heifers regarding the variables assessed (Table 4).

Table 4. Results for the Oneway ANOVA test, including 49 Holstein heifers, for the variables serum progesterone concentration (Serum P4), corpus luteum area (CLA), largest diameter of the CL (LADCL), and minor diameter of the CL (MIDCL) according to the pregnancy diagnosis 30–40 days after the embryo transfer procedure: negative (NO) or positive (YES).

Pregnancy	n	Serum P4 (ng/mL)	CLA (cm^2)	LADCL (cm)	MIDCL (cm)
NO	27	9.02 ± 8.31	3.92 ± 1.19	2.74 ± 0.42	1.87 ± 0.35
YES	22	9.54 ± 7.16	4.36 ± 1.00	2.93 ± 0.48	1.92 ± 0.33

3.2. Experiment 2

Of the 108 heifers initially evaluated, 97 were finally included in the study as recipients. Of these 97 heifers, 3 had two CL, and were excluded from the study. Consequently, the total number of animals included was 94, of which 67 animals were pregnant after ET, and 27 remained non-pregnant (pregnancy rate = 69%).

Results for the binary logistic regression showed that there are not significant differences between pregnant and non-pregnant heifers concerning the variables included in the model except for a tendency observed for the veterinarian who performed the ET

MAJALAH EDISI 12 TAHUN 2023, DESEMBER 2023 Halaman 222

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

(OR = 2.476, p = 0.06; Tables 5 and 6). The Hosmer and Lemeshow test was not significant (p = 0.799), and the overall significance of the model was p = 0.05.

Table 5. Descriptive statistics (mean ± standard deviation) of Experiment 2 for the largest diameter of the corpus luteum (LADCL), minor diameter of the CL (MIDCL), volume of the CL, the percentage of ovary that corresponds to the CL (%CLOV), serum progesterone concentration (Serum P4), body condition score (BCS), glucose, total cholesterol, albumin, total protein, triglyceride, ALAT, ASAT, GGT, urea, BHB, and NEFA of 94 heifers according to their pregnancy diagnosis after embryo transfer.

Variable	Pregnant (n = 67)	Not Pregnant (n = 27)
LADCL (mm)	28.55 ± 3.73	27.86 ± 3.95
MIDCL (mm)	18.96 ± 3.93	19.60 ± 3.99
VOLCL (mm^3)	7148.52 ± 3064.74	7165.99 ± 2876.72
%CLOV	48.11 ± 15.71	45.62 ± 11.13
Serum P4 (ng/mL)	16.30 ± 11.89	17.45 ± 13.28
BCS	2.94 ± 0.27	3.03 ± 0.31
Glucose (mg/dL)	76.85 ± 28.32	76.13 ± 16.35
Total cholesterol (mg/dL)	118.29 ± 43.12	112.22 ± 31.00
Albumin (g/L)	31.82 ± 7.85	30.75 ± 7.34
Total proteins (g/L)	62.12 ± 4.27	63.00 ± 7.29
Triglycerides (mg/dL)	54.39 ± 76.03	62.48 ± 87.56
AST (U/L)	116.99 ± 63.54	119.48 ± 60.99
ALT (U/L)	51.92 ± 38.13	49.77 ± 53.97
GGT (U/L)	25.73 ± 7.39	27.21 ± 11.48
Urea (mg/dL)	31.61 ± 10.41	30.21 ± 9.36
BHB (mmol/L)	0.36 ± 0.32	0.32 ± 0.21
NEFA (mmol/L)	0.58 ± 0.81	0.79 ± 1.13

Table 6. Descriptive statistics of Experiment 2 for the percentage of pregnant Holstein heifers (n = 94) after embryo transfer regarding the following variables: presence of a corpus luteum (CL) with a cavity, administration of flunixin meglumine at embryo transfer, type of cryoprotectant agent used for embryo preservation, veterinarian who performed the embryo transfer, and the synchronization protocol used.

Variable		n	Pregnant Heifers
CL with cavity	YES	33	22/33 (66.7%)
	NO	61	45/61 (73.4%)
Flunixin meglumine	YES	9	5/9 (55.6%)
	NO	85	62/85 (72.9%)
Embryo preservation	Ethylene glycol	64	44/64 (68.7%)
	Glycerol	17	12/17 (70.6%)
	Fresh	13	11/13 (84.6%)
Veterinarian *	1	48	39/48 (81.2%)
	2	45	27/45 (61.7%)
Synchronization protocol	PRID7PG6	76	55/76 (72.2%)
	PRID8PG7	18	12/18 (66.7%)

* p = 0.06.

4. Discussion

Our results for the correlation analysis in Experiment 1 showed that there is a positive, statistically significant correlation between serum P4 concentrations and CL measurements like CLA and MIDCL. Consequently, B-mode US may provide proper information about CL function and may be a useful tool to select recipients before ET. These findings are in accordance with those observed by other researchers, who stated that CLA is closely related to P4 concentrations and has the greatest association with luteal function during CL development [22,23]. In this regard, a recent study by our laboratory [16] showed that

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

CLA could be the parameter of choice when using B-mode US to assess luteal function. However, it should be noted that Doppler US is becoming more popular nowadays, and numerous investigations are carried out to assess its accuracy as a tool for reproductive management [26–29]. So far, research has been made on the usefulness of Doppler US to determine CL function, and promising results were obtained, especially regarding luteolysis detection and early pregnancy diagnosis [16,30–33]. With respect to ET, the relationship between CL blood flow and recipient selection, pregnancy rates, and early pregnancy diagnosis has been studied, observing more favorable results in the first case [5,15,34].

Regarding RP, results for the Oneway ANOVA analysis showed that there were statistically significant differences between HB3 and HB2 for CLA, LADCL, and MIDCL. Additionally, differences were also observed between HB3 and CL2 for CLA and MIDCL. Finally, serum P4 concentrations significantly differ between HB3 and the absence of CL. On the other hand, no significant differences were found between HB3 and CL3. Due to the similar values obtained for HB3 and CL3 with respect to size measurements and P4 concentration, US and P4 determination do not seem to be proper approaches to discern between these two luteal structures, which are present from days 6 to 17 of the estrous cycle. To correctly perform ET, recipients should ideally be around day 7 of the estrous cycle, according to the age of the embryo [35]. Our results suggest that US and P4 determination are useful for identifying developing (HB1, HB2) or under-regressed CL (CL2, CL1), but that only RP would allow us to distinguish between HB3 and CL3, using the firmness as an indicator of luteal age. As the estrous cycle progresses, the CL becomes firmer and more compact. However, there is not a significant correlation, neither between its firmness and progesterone concentration at a mature state, nor between its firmness and luteal size [24]. This characteristic might be evaluated using US considering the echotexture [36]. Nevertheless, although it has been stated that luteal tissue heterogeneity is considered a potential indicator of CL function [14], no significant differences in CL echotexture characteristics were found between days 7 and 18 of the estrous cycle [37].

As for pregnancy rates, no statistically significant differences were observed for serum P4 concentration, CLA, LADCL, and MIDCL in cows selected via RP, i.e., those who had a HB3 present in the ovary at the time of ET. These findings suggest that neither P4 determination nor US provide additional information to RP that could lead to the selection of recipients with higher odds of maintaining the pregnancy. However, it should be considered that there are additional factors that might condition the outcome of the ET and might be used as possible indicators of pregnancy rate. In this regard, Frade et al. [38] reported that the manifestation of estrous behavior may have a positive relationship with pregnancy rates in ET programs, which may be due to the effects of the estrogens on the endometrial tissue. Similarly, other researchers also stated that cows that displayed estrus had better ovarian responses (larger follicles, larger CL, and greater P4 concentrations) and improved pregnancy outcomes after timed artificial insemination programs [39].

Concerning Experiment 2, our results for the binary logistic regression showed that, among all the variables studied, only the veterinarian who performed the ET tended to influence the subsequent pregnancy rate. It is widely accepted that the practitioner competence is a key point in the success of ET, along with good-quality embryos and recipient management [2]. It should be mentioned that both veterinarians who performed the ET in this experiment had significant experience in this field and pregnancy rates were optimal (81.6 and 61.7%); nevertheless, these results emphasize the importance of this factor and disclose the diversity of aptitudes even among qualified professionals.

On the other hand, none of the CL measurements showed significant differences between pregnant and non-pregnant recipients. As in Experiment 1, LADCL and MIDCL did not differ between groups. Similarly, neither the VOLCL, nor the %CLOV, seemed to be reliable indicators of the ET outcome. As mentioned above, the presence of a functional CL in the ovary is indispensable in order to maximize the odds of pregnancy after ET. Recipients in this experiment were selected according to the size of the CL (LADCL > 18 mm). Therefore, the lack of significance can be explained by the fact that only heifers

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

with a functional CL were included in the study, i.e., once CL size is beyond a certain threshold, higher measurements do not imply better odds of pregnancy. Similar effects have been previously described, as researchers claimed that, in ET procedures, there is a positive relationship between pregnancy rate and CL area until luteal tissue reaches a certain size [5].

In terms of cavitary CL, our results showed that the pregnancy rate did not differ between cows with cavitary or homogeneous CL, as previously reported by Perez-Marin [40]. It is known that the presence of a cavity inside the CL is not a detrimental factor for progesterone production. However, different results have been reported about this topic. Some researchers stated that the presence of a luteal cavity did not influence progesterone production throughout the complete estrous cycle [40], while others described higher progesterone levels, and higher pregnancy rates, in heifers with a cavitary CL [11,18]. Consequently, it is clear that further research is needed to shed light on this matter and clarify if the luteal cavity may influence the outcome of ET and artificial insemination (AI).

Regarding the type of preservation used for the embryos, we observed higher pregnancy rates in the fresh group. In this regard, Hansen [4] also described lower (7.4%) pregnancy rates for cows receiving cryopreserved embryos than those receiving fresh embryos. However, no statistically significant differences were present in our study with respect to ethylene glycol and glycerol groups for pregnancy rate. One possible explanation could be the lack of statistical power due to the low number of heifers in the fresh and glycerol groups.

Another aspect to consider is the metabolic status and health of the recipients. We did not observe statistically significant differences regarding BCS or the metabolic indicators analyzed between pregnant and non-pregnant recipients. As animal husbandry and management factors, including disease status, nutrition, and reproductive health, play a crucial role in the success of the ET, the selection of the recipients must include the validation of these indicators [2,6]. In our study, a previous examination of heifers was performed to select which animals would be enrolled. Therefore, it is very probable that, as only heifers with adequate health were selected, the detrimental effects that nutritional issues may have on pregnancy rates were screened at this point.

Finally, no statistically significant differences were observed for the synchronization protocol and the administration of flunixin meglumine. Concerning the synchronization protocol, it should be considered that there is a wide variety of protocols used for ET in the literature. In this way, protocols including progesterone release devices, like the ones in our study, work well to synchronize heat in heifers [41]. Therefore, as long as heat detection was properly performed and ET was carried out in due time, it was expected to obtain similar results regarding pregnancy rates. However, the difference of sample size between groups cannot be ignored, as it may impair the statistical power of the model. As for the use of flunixin meglumine, it has been reported that its administration at the time of ET improved pregnancy rates in cows [42]. Similarly, Purcell et al. reported a beneficial effect of this treatment on pregnancy rates, but this was dependent of the location effect [43]. Additionally, it has been observed that the administration of flunixin meglumine to cows with subclinical endometritis has a positive effect on pregnancy rate [44]. Given the disparity of the results, additional research including a higher number of animals is needed.

5. Conclusions

In conclusion, RP and US are useful for performing the selection of recipients for ET by means of luteal function evaluation. Moreover, RP would allow us to discern between different luteal structures (HB3 and CL3) that are present around the days of ET and that cannot be distinguished by US or P4 determination. Additionally, in recipients selected using RP, measurements for luteal area, diameters, and P4 determination do not seem to offer additional data that would refine the selection of animals with higher odds of maintaining the pregnancy. Finally, neither %CLOV nor the presence of a luteal

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

cavity appear to be good indicators for pregnancy rates in ET procedures. Therefore, further research is required to enhance the selection of recipients and additional studies on innovative approaches like Doppler ultrasonography and uterine features should be performed.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani13182865/s1, Table S1: Embryo management, according to the cryoprotectant agent, to perform the embryo transfer in Holstein heifers..

Author Contributions: Conceptualization, U.Y. and L.A.Q.; methodology, U.Y., M.B., I.F. and L.A.Q.; validation, U.Y., M.B., I.F., P.G.H., J.J.B., A.I.P. and L.A.Q.; formal analysis, U.Y. and L.A.Q.; investigation, U.Y., M.B., I.F., P.G.H., J.J.B., A.I.P. and L.A.Q.; resources, U.Y., M.B., I.F., P.G.H. and L.A.Q.; data curation, U.Y. and L.A.Q.; writing—original draft preparation, U.Y.; writing—review and editing, U.Y., P.G.H., J.J.B., A.I.P. and L.A.Q.; visualization, U.Y., J.J.B. and L.A.Q.; supervision, M.B., I.F., P.G.H., J.J.B., A.I.P. and L.A.Q.; project administration, L.A.Q.; funding acquisition, L.A.Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Uxía Yáñez was funded by Xunta de Galicia (Predoctoral Contract Ref. 2020/122).

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the European and Spanish Regulations for the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU, RD 53/2013). The animal study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the University of Santiago de Compostela.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge the farmers from the Galician farms where the embryo transfers were performed for the facilities, animals, and assistance provided for the development of the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders and the company Xénese E.T.E. had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Alberio, R.H. Manejo de Donantes y Receptoras. In *Biotecnología de la Reproducción*; Palma, G.A., Ed.; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: Buenos Aires, Argentina, 2001; pp. 21–26.
2. Hasler, J.F. Forty Years of Embryo Transfer in Cattle: A Review Focusing on the Journal Theriogenology, the Growth of the Industry in North America, and Personal Reminisces. *Theriogenology* **2014**, *81*, 152–169. [CrossRef]
3. Roper, D.A.; Schrick, F.N.; Edwards, J.L.; Hopkins, F.M.; Prado, T.M.; Wilkerson, J.B.; Saxton, A.M.; Young, C.D.; Smith, W.B. Factors in Cattle Affecting Embryo Transfer Pregnancies in Recipient Animals. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *199*, 79–83. [CrossRef]
4. Hansen, P.J. The Incompletely Fulfilled Promise of Embryo Transfer in Cattle—Why Aren't Pregnancy Rates Greater and What Can We Do about It? *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, skaa288. [CrossRef] [PubMed]
5. Pugliesi, G.; Dalmaso de Melo, G.; Silva, J.B.; Carvalhêdo, A.S.; Lopes, E.; de Siqueira Filho, E.; Silva, L.A.; Binelli, M. Use of Color-Doppler Ultrasonography for Selection of Recipients in Timed-Embryo Transfer Programs in Beef Cattle. *Theriogenology* **2019**, *135*, 73–79. [CrossRef] [PubMed]
6. Stroud, B.; Hasler, J.F. Dissecting Why Superovulation and Embryo Transfer Usually Work on Some Farms but Not on Others. *Theriogenology* **2006**, *65*, 65–76. [CrossRef] [PubMed]
7. Vasconcelos, J.L.M.; Demétrio, D.G.B.; Santos, R.M.; Chiari, J.R.; Rodrigues, C.A.; Filho, O.G.S. Factors Potentially Affecting Fertility of Lactating Dairy Cow Recipients. *Theriogenology* **2006**, *65*, 192–200. [CrossRef]
8. Siqueira, L.G.B.; Torres, C.A.A.; Souza, E.D.; Monteiro, P.L.J.; Arashiro, E.K.N.; Camargo, L.S.A.; Fernandes, C.A.C.; Viana, J.H.M. Pregnancy Rates and Corpus Luteum–Related Factors Affecting Pregnancy Establishment in Bovine Recipients Synchronized for Fixed-Time Embryo Transfer. *Theriogenology* **2009**, *72*, 949–958. [CrossRef]
9. Mann, G.; Lamming, G. Relationships between Maternal Endocrine Environement, Early Embryo Development and Inhibition of the Luteolytic Mechanism in Cows. *Reproduction* **2001**, *121*, 175–180. [CrossRef]
10. Wathes, D.; Taylor, V.; Cheng, Z.; Mann, G. Follicle Growth, Corpus Luteum Function and Their Effects on Embryo Development in Postpartum Dairy Cows. *Reproduction* **2003**, *61*, 219–237. [CrossRef] [PubMed]
11. Jaśkowski, B.M.; Herudzińska, M.; Gehrke, M.; Niżański, W. The Impact of the Cavitary Corpus Luteum on the Blood Progesterone Concentration and Pregnancy Rate of Embryo Recipient Heifers. *Theriogenology* **2022**, *178*, 73–76. [CrossRef]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

12. Say, E.; Özmen, M.F.; Sağirkaya, H. The Influence of Corpus Luteum Size on the Conception in Embryo Transfer Recipient Cows. *Livest. Stud.* **2021**, *61*, 77–81. [CrossRef]
13. Yoshida, T.; Seki, M.; Watanabe, N.; Furuta, H.; Yoshimura, I.; Osada, M.; Chiba, K.; Okada, K.; Kawasumi, K.; Ushijima, H. Relation of Reproductive Performances and Rectal Palpation for Luteum Function of Heifers 7° Days after Estrus. *Anim. Sci. J.* **2012**, *83*, 207–212. [CrossRef]
14. Siqueira, L.G.B.; Torres, C.A.A.; Amorim, L.S.; Souza, E.D.; Camargo, L.S.A.; Fernandes, C.A.C.; Viana, J.H.M. Interrelationships among Morphology, Echotexture, and Function of the Bovine Corpus Luteum during the Estrous Cycle. *Anim. Reprod. Sci.* **2009**, *115*, 18–28. [CrossRef]
15. Utt, M.D.; Johnson, G.L.; Beal, W.E. The Evaluation of Corpus Luteum Blood Flow Using Color-Flow Doppler Ultrasound for Early Pregnancy Diagnosis in Bovine Embryo Recipients. *Theriogenology* **2009**, *71*, 707–715. [CrossRef] [PubMed]
16. Yáñez, U.; Murillo, A.V.; Becerra, J.J.; Herradón, P.G.; Peña, A.I.; Quintela, L.A. Comparison between Transrectal Palpation, B-Mode and Doppler Ultrasonography to Assess Luteal Function in Holstein Cattle. *Front. Vet. Sci.* **2023**, *10*, 1162589. [CrossRef]
17. Daly, J.; Smith, H.; McGrice, H.A.; Kind, K.L.; van Wettere, W.H.E.J. Towards Improving the Outcomes of Assisted Reproductive Technologies of Cattle and Sheep, with Particular Focus on Recipient Management. *Animals* **2020**, *10*, 293. [CrossRef] [PubMed]
18. Jaśkowski, B.M.; Bostedt, H.; Gehrke, M.; Jaśkowski, J.M. Ultrasound Characteristics of the Cavitary Corpus Luteum after Oestrus Synchronization in Heifers in Relation to the Results of Embryo Transfer. *Animals* **2021**, *11*, 1706. [CrossRef] [PubMed]
19. Wenzinger, B.; Bleul, U. Effect of a Prostaglandin F2α Analogue on the Cyclic Corpus Luteum during Its Refractory Period in Cows. *BMC Vet. Res.* **2012**, *8*, 220. [CrossRef]
20. Stevenson, J.S.; Pulley, S.L.; Mellieon, H.I. Prostaglandin F2α and Gonadotropin-Releasing Hormone Administration Improve Progesterone Status, Luteal Number, and Proportion of Ovular and Anovular Dairy Cows with Corpora Lutea before a Timed Artificial Insemination Program. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 1831–1844. [CrossRef]
21. Szelényi, Z.; Győri, D.; Boldizsár, S.; Kovács, L.; Répási, A.; Molnár, L.; Szenci, O. Pregnancy and Stillbirth Losses in Dairy Cows with Singleton and Twin Pregnancies. *Acta Vet. Hung.* **2019**, *67*, 115–126. [CrossRef]
22. Bo, G.A.; Mapletoft, R.J. Evaluation and Classification of Bovine Embryos. *Anim. Reprod.* **2013**, *10*, 344–348.
23. Zemjanis, R. *Diagnostic and Therapeutic Tecniques in Animal Reproduction*; The Williams and Wilkins Company: Baltimore, MA, USA, 1970.
24. Hanzen, C.H.; Pieterse, M.; Scenczi, O.; Drost, M. Relative Accuracy of the Identification of Ovarian Structures in the Cow by Ultrasonography and Palpation Per Rectum. *Vet. J.* **2000**, *159*, 161–170. [CrossRef]
25. Rocha, C.C.; Martins, T.; Cardoso, B.O.; Silva, L.A.; Binelli, M.; Pugliesi, G. Ultrasonography-Accessed Luteal Size Endpoint That Most Closely Associates with Circulating Progesterone during the Estrous Cycle and Early Pregnancy in Beef Cows. *Anim. Reprod. Sci.* **2019**, *201*, 12–21. [CrossRef]
26. Acosta, T.J.; Yoshizawa, N.; Ohtani, M.; Miyamoto, A. Local Changes in Blood Flow Within the Early and Midcycle Corpus Luteum after Prostaglandin F 2 Injection in the Cow 1. *Biol. Reprod.* **2002**, *66*, 651–658. [CrossRef]
27. Lüttgenau, J.; Bollwein, H. Evaluation of Bovine Luteal Blood Flow by Using Color Doppler Ultrasonography. *Reprod. Biol.* **2014**, *14*, 103–109. [CrossRef] [PubMed]
28. Ginther, O.J. *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction*; Equiservices Pub: Cross Plains, WI, USA, 1995; ISBN 0964007282.
29. Yáñez, U.; Becerra, J.J.; Herradón, P.G.; Peña, A.I.; Quintela, L.A. Ecografía Doppler y Su Aplicación En Reproducción Bovina: Revisión. *Inf. Tec. Econ. Agrar.* **2021**, *118*, 82–100. [CrossRef]
30. Siqueira, L.G.B.; Areas, V.S.; Ghetti, A.M.; Fonseca, J.F.; Palhao, M.P.; Fernandes, C.A.C.; Viana, J.H.M. Color Doppler Flow Imaging for the Early Detection of Nonpregnant Cattle at 20 Days after Timed Artificial Insemination. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 6461–6472. [CrossRef]
31. Dubuc, J.; Houle, J.; Rousseau, M.; Roy, J.P.; Buczinski, S. Short Communication: Accuracy of Corpus Luteum Color Flow Doppler Ultrasonography to Diagnose Nonpregnancy in Dairy Cows on Day 21 after Insemination. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 2019–2023. [CrossRef] [PubMed]
32. Siqueira, L.G.; Arashiro, E.K.; Ghetti, A.M.; Souza, E.D.; Feres, L.F.; Pfeifer, L.F.; Fonseca, J.F.; Viana, J.H. Vascular and Morphological Features of the Corpus Luteum 12 to 20 Days after Timed Artificial Insemination in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 5612–5622. [CrossRef]
33. Herzog, K.; Brockhan-Lüdemann, M.; Kaske, M.; Beindorff, N.; Paul, V.; Niemann, H.; Bollwein, H. Luteal Blood Flow Is a More Appropriate Indicator for Luteal Function during the Bovine Estrous Cycle than Luteal Size. *Theriogenology* **2010**, *73*, 691–697. [CrossRef]
34. Pugliesi, G.; de Melo, G.D.; Ataíde, G.A.; Pellegrino, C.A.G.; Silva, J.B.; Rocha, C.C.; Motta, I.G.; Vasconcelos, J.L.M.; Binelli, M. Use of Doppler Ultrasonography in Embryo Transfer Programs: Feasibility and Field Results. *Anim. Reprod.* **2018**, *15*, 239–246. [CrossRef]
35. Ferraz, P.A.; Burnley, C.; Karanja, J.; Viera-Neto, A.; Santos, J.E.P.; Chebel, R.C.; Galvão, K.N. Factors Affecting the Success of a Large Embryo Transfer Program in Holstein Cattle in a Commercial Herd in the Southeast Region of the United States. *Theriogenology* **2016**, *86*, 1834–1841. [CrossRef]
36. Herzog, K.; Kiossis, E.; Bollwein, H. Examination of Cyclic Changes in Bovine Luteal Echotexture Using Computer-Assisted Statistical Pattern Recognition Techniques. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, *106*, 289–297. [CrossRef]

37. Scully, S.; Evans, A.C.O.; Carter, F.; Duffy, P.; Lonergan, P.; Crowe, M.A. Ultrasound Monitoring of Blood Flow and Echotexture of the Corpus Luteum and Uterus during Early Pregnancy of Beef Heifers. *Theriogenology* **2015**, *83*, 449–458. [CrossRef] [PubMed]
38. Frade, M.C.; Frade, C.; Cordeiro, M.B.; Sá Filho, M.F.d.; Mesquita, F.S.; Nogueira, G.d.P.; Binelli, M.; Membrive, C.M.B. Manifestation of Estrous Behavior and Subsequent Progesterone Concentration at Timed-Embryo Transfer in Cattle Are Positively Associated with Pregnancy Success of Recipients. *Anim. Reprod. Sci.* **2014**, *151*, 85–90. [CrossRef] [PubMed]
39. Sá Filho, M.F.; Santos, J.E.P.; Ferreira, R.M.; Sales, J.N.S.; Baruselli, P.S. Importance of Estrus on Pregnancy per Insemination in Suckled Bos Indicus Cows Submitted to Estradiol/Progesterone-Based Timed Insemination Protocols. *Theriogenology* **2011**, *76*, 455–463. [CrossRef]
40. Perez-Marin, C. Formation of Corpora Lutea and Central Luteal Cavities and Their Relationship with Plasma Progesterone Levels and Other Metabolic Parameters in Dairy Cattle. *Reprod. Domest. Anim.* **2009**, *44*, 384–389. [CrossRef]
41. Martinez, M.F.; Adams, G.P.; Kastelic, J.P.; Bergfelt, D.R.; Mapletoft, R.J. Induction of Follicular Wave Emergence for Estrus Synchronization and Artificial Insemination in Heifers. *Theriogenology* **2000**, *54*, 757–769. [CrossRef] [PubMed]
42. Scenna, F.N.; Hockett, M.E.; Towns, T.M.; Saxton, A.M.; Rohrbach, N.R.; Wehrman, M.E.; Schrick, F.N. Influence of a Prostaglandin Synthesis Inhibitor Administered at Embryo Transfer on Pregnancy Rates of Recipient Cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2005**, *78*, 38–45. [CrossRef]
43. Purcell, S.H.; Beal, W.E.; Gray, K.R. Effect of a CIDR Insert and Flunixin Meglumine, Administered at the Time of Embryo Transfer, on Pregnancy Rate and Resynchronization of Estrus in Beef Cattle. *Theriogenology* **2005**, *64*, 867–878. [CrossRef]
44. Barnes, M.; Kasimanickam, R.; Kasimanickam, V. Effect of Subclinical Endometritis and Flunixin Meglumine Administration on Pregnancy in Embryo Recipient Beef Cows. *Theriogenology* **2023**, *201*, 76–82. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Animal 17 (2023) 100752

Contents lists available at ScienceDirect

Animal
The international journal of animal biosciences

Review: Current status of corpus luteum assessment by Doppler ultrasonography to diagnose non-pregnancy and select embryo recipients in cattle

Guilherme Pugliesi [a,*], Amanda Guimarães da Silva [a], Joao Henrique Moreira Viana [b], Luiz Gustavo Bruno Siqueira [c]

[a] Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, SP 13635-900, Brazil
[b] Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF 70770-190, Brazil
[c] Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG 36038-330, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 October 2022
Revised 13 February 2023
Accepted 20 February 2023

Keywords:
Embryo
Imaging technologies
Luteal function
Pregnancy
Progesterone

ABSTRACT

A number of potentials uses of Doppler ultrasonography have been explored in the last decades, both as research tools in reproductive physiology investigations and for the reproductive management of farm animals. The objective of this review was to address some of the recent strategies developed in fixed-time reproductive programs and resynchronization of ovulation in cattle, based on the evaluation of corpus luteum function by color-Doppler ultrasound imaging. Recent studies in dairy and beef cattle pointed out to a high accuracy when Doppler ultrasonography is used to assess the functionality of the corpus luteum and identify non-pregnant females at 20–24 days after breeding. Therefore, super-early resynchronization programs starting in the second week after timed-artificial insemination or embryo transfer have been developed and are being implemented in commercial assisted reproduction programs; thus, anticipating conception with proven semen or genetically superior embryos. In addition, assessment of corpus luteum blood perfusion can be used for identifying high fertility embryo recipients in fixed-time embryo transfer programs.
© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of The Animal Consortium. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Implications

Current alternatives to evaluate corpus luteum function by color-Doppler ultrasound imaging pointed to new tools that could improve reproductive performance and profitability of dairy and beef cattle operations. Defined methods to determine luteal blood perfusion allowed the estimation of luteal function at different phases of the estrous cycle and early pregnancy and its association with circulating progesterone profile. This review provides an overview of the technical and physiological concepts underlying the use of Doppler ultrasonography for the assessment of corpus luteum blood perfusion and highlights the applications in the reproductive management in order to build applied uses in cattle.

Introduction

The basic principle of the Doppler ultrasound is the Doppler effect, a shift in the frequency of the sound wave reflected by an object moving toward or away from the probe. In medical ultrasound, this shift is observed in the echo from blood cells and is, thus, used to depict blood flow within a tissue or organ (Ginther, 2007). The Doppler ultrasound provides important information about the functional status of a tissue or organ, leading to its adoption in many areas of human and veterinary medicine. In cattle reproduction, Doppler ultrasound has been used for over two decades for the study of vascular perfusion in the ovaries, uterus and vagina, as well as fetuses and placenta (reviewed by Herzog & Bollwein, 2007; Matsui & Miyamoto, 2009; Bollwein et al., 2016).

In spite of the undeniable gains for diagnostic quality and accuracy, devices equipped with Doppler mode and respective licenses are usually significantly more expensive than their conventional, B-mode-only counterparts. This price difference hampered a broader adoption of the technology by field practitioners in the past. A turning point was the demonstration that Doppler ultrasound could be used as a practical tool for the reproductive management of herds, particularly for the early diagnosis of non-pregnancy based on corpus luteum (**CL**) blood perfusion (**CLBP**) (Siqueira et al., 2013; Pugliesi et al., 2014). The early detection of non-pregnant cattle is critical for the development of strategies

* Corresponding author.
E-mail address: gpugliesi@usp.br (G. Pugliesi).

https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100752
1751-7311/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of The Animal Consortium.
This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

to reduce the number of days open and calving intervals, thus improving reproductive performance of cattle herds (Gnemmi et al., 2022). The development of practical applications of Doppler ultrasound in reproductive management ultimately led to a substantial increase in the interest on the technology, as seen by the number of scientific papers published in this subject over the past 10 years by crossing related key words in databases such as PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/).

The aim of this review is to present the technical and physiological concepts underlying the use of color-Doppler ultrasonography for the assessment of CLBP, and subsequent applications in the reproductive management of dairy and beef herds.

Corpus luteum assessment by Doppler ultrasonography

The Doppler signal can be displayed at the ultrasound device screen as spectral graphs or color-flow images. The spectral mode presents the Doppler signal as a time × velocity graphic, depicting changes in blood flow associated with the cardiac cycle (Ginther, 2007). Blood velocities and the pulsatility and resistance indexes can be obtained from the spectral graph. However, such measurements are calculated for an individual artery and, thus are more useful if a single, large vessel, accounts for most of a tissués or organś blood supply (e.g., the uterine artery; Herzog & Bollwein, 2007). Moreover, immobility is required to obtain a good spectral graph, particularly for small vessels, making the exam time-consuming and frequently not feasible in large animals. Therefore, most studies on CLBP in cattle were performed based on the analysis of the colored area displayed in the color-flow Doppler image.

The color-flow mode generates real-time and easy-to-interpret images of the blood perfusion, which depicts the vascularization of the CL. The use of color-Doppler data for research or as a diagnostic tool, however, usually requires a comparative analysis considering changes over time, or individual differences among animals, or even relative to cutoff values. Therefore, after visual assessment, CLBP still needs to be quantified. In this regard, one must consider that the CL is surrounded by complex plexuses of tortuous capillaries and small vessels (Macchiarelli et al., 1998), making the correct estimation of its vascularization a major challenge. Different approaches have been proposed to evaluate CLBP, taking into account not only accuracy but also the magnitude of expected differences, the possibility of real-time decisions, and feasibility under field conditions.

The most straightforward way to characterize CLBP is the subjective scoring by the evaluator of the amount of colored area within the Doppler image (Siqueira et al., 2013; Guimarães et al., 2015) (Fig. 1). This approach has the advantage to account for the whole scanning of the tissue, because the score is given based on a mental 3D reconstruction of the organ. Moreover, it allows real-time diagnosis and rapid decision-making, which is frequently required for a practical use of the technology. As for any other subjective scoring system, it relies on the evaluatoŕs experience and consistency tend to increase over time. The agreement rate between evaluators with similar knowledge of the technology is very high though, and the correlation with objective evaluations is high (Siqueira et al., 2013).

Although the technician can perceive small differences in blood perfusion, the scoring system limits our capacity to discriminate them. In this regard, the accuracy of the diagnosis depends on the expected difference among categories. For instance, CLBP dramatically changes between pregnant and non-pregnant cattle from day 16 after AI onwards (Siqueira et al., 2019), and a subjective score can be effectively used to predict non-pregnant status (Siqueira et al., 2013; Pugliesi et al., 2014). On the other hand, association studies such as those to determine the relationship between CLBP and progesterone (**P4**) production may require the discrimination of minor changes in CLBP (Herzog et al., 2010; Pugliesi et al., 2019b).

The colored area or the number of colored pixels (RGB value ≠ 0) within an image could be objectively measured using internal calipers of the ultrasound device or assisted by an image analysis software (Herzog et al., 2010; Siqueira et al., 2019) (Fig. 2). The results are presented as a continuous variable, expressed as absolute (e.g., mm^2) or relative (% of tissue) values. The use of relative indexes is interesting because it takes into account the total volume of tissue supported by a certain amount of blood supply and thus provides a better idea of its physiological status. In fact, Siqueira et al. (2019) obtained a slightly higher area under curve for CLBP adjusted by CL size than for CLBP alone (0.81 vs 0.78, respectively) in the Receiving Operator Curve analysis used to determine the relationships between each CL endpoint and pregnancy status.

Images generated with either color-flow or power Doppler can be used to measure blood perfusion. Depending on the device settings, however, the colored signal in images generated with power Doppler may have blurry edges, compared with those from color Doppler (Fig. 2A and B), thus making it difficult to delimitate a specific-colored area. On the other hand, flow intensity information provided by power Doppler would be more useful than flow direction, typically assessed by color Doppler. Nevertheless, differences in mean pixel color are more complex to analyze and are currently not taken into account in most studies.

For research purposes, the calculation of blood perfusion area can overcome the intrinsic limitations related to score subjectivity and to the lack of statistical power associated with analysis of discrete variables. This approach, however, requires the selection of a representative image frame, which end up creating a certain degree of subjectivity as well. Frequently, this selected image is

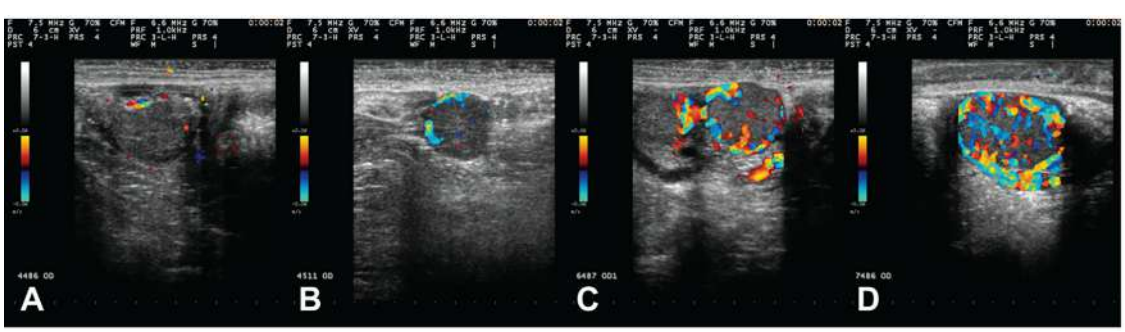


Fig. 1. (A–D) Color-Doppler images of bovine corpora lutea showing different degrees of CLBP (increasing from A to D). Panel A also represents non-pregnant females diagnosed based on the CLBP to detect luteolysis (CL with ≤25% of blood perfusion and without color signals in the center of the luteal tissue). Panels B, C and D also indicate, respectively, low, medium and high CLBP. Abbreviations: CLBP = corpus luteum blood perfusion; CL = corpus luteum.

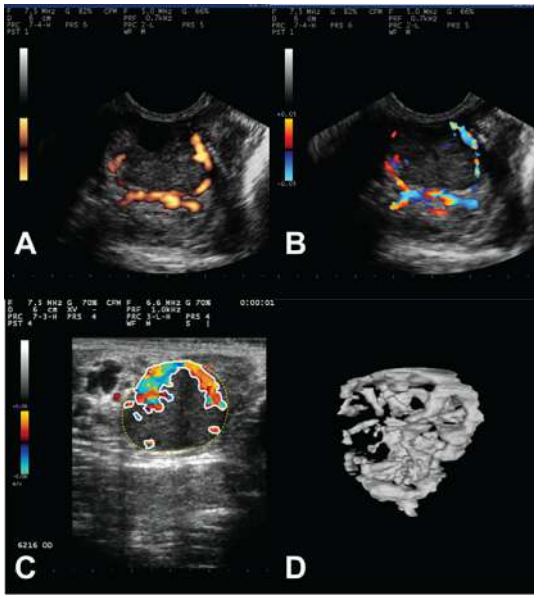


Fig. 2. (A–D) Different approaches to evaluate Doppler images of bovine corpora lutea. (A, B) subjective evaluation of images generated with power- (A) or color-flow (B) Doppler; (C) objective quantification of the colored area within a CL assessed by color-flow imaging. Colored pixels are delimited by a white line and the entire CL area by a yellow-dotted line; (D) Three-dimensional reconstruction of CLBP. Abbreviations: CLBP = corpus luteum blood perfusion; CL = corpus luteum.

arbitrarily defined as the cross-section frame of the central area of the CL at its maximum diameter or the frame with the greater amount of Doppler signal (Viana et al., 2013). Nevertheless, due to the uneven distribution of vascularization around follicles and CL, even minor differences in probe position or angle may cause bias in measurements, as observed for ovarian follicles (Arashiro et al., 2013).

Objective measurement of the color-Doppler signal usually requires postacquisition image processing and analysis. Fortunately, the current trend in biomedical imaging is that computer-assisted image analysis tools will become progressively available as embedded technology in ultrasound devices, allowing real-time diagnosis. In general, single-image analysis does not demand a great computer processing capacity and many software for image analysis, including some license-free or open-source, are widely available.

Volumetry is currently used in internal medicine imaging to measure structures of irregular shape and could be an alternative to assess CLBP. The vascularization of the CL is typically branched and tortuous, and the three- or four-dimensional (**3D/4D**) reconstruction is likely to provide the best representation of the vascular architecture of the tissue (Viana et al., 2013). In fact, this approach takes into account multiple frames representing the whole organ, while providing an objective measurement of the Doppler signal (Scully et al., 2014). The limitations for the use of volumetry for CLBP evaluation are mostly technological. Ultrasound built-in 3D/4D measurement tools require substantial data processing capacity. In addition, postprocessing image analysis using recorded videoclips is labor-intensive and demand-specific 3D reconstruction software (Viana et al., 2013; Scully et al., 2014). Most 3D/4D ultrasound devices currently available are either too expensive and unsuitable for use in the field or lack processing capacity to avoid image delay and associated distortion due to organ movement during scanning. Nevertheless, technological advances may turn volumetry into an important tool for the study of CL hemodynamics in the future.

Luteal blood perfusion during the estrous cycle and early pregnancy

The CL is a transitory endocrine gland that secretes primarily P4, which is essential for pregnancy establishment in ruminants and other farm animals (Mann and Lamming, 1995). Development of the CL after ovulation is often divided into three main phases: early luteal phase or luteogenesis; mid-luteal or static phase; regression or luteolysis (Niswender et al., 2000). The maternal recognition of pregnancy is associated to the maintenance of a fully functional CL, secreting adequate amounts of P4 to support early embryonic development (Lonergan, 2011).

Due to its transitory nature, the CL must develop physically and functioning very rapidly just so an eventual gestation can be established or, in case of conception failure, a new estrous cycle begins. These particular features of the CL are mainly governed by intense angiogenesis (Acosta and Miyamoto, 2004) for appropriate development of luteal cells during luteogenesis (early luteal phase), and nutrients and steroid precursors delivery to support P4 secretion into the bloodstream (mid-luteal phase). Because of this highly angiogenic and vascular nature of the CL (Fraser and Wulff, 2003), the use of Doppler ultrasonography has become a reliable and useful tool to indirectly assess CL function by imaging blood perfusion into the gland (Bollwein et al., 2016).

In this scenario, color-Doppler flow imaging has long been successfully used to quantify blood flow to the ovaries of ruminants during a regular estrous cycle (Honnens et al., 2008; Herzog et al., 2010). Blood perfusion in the ovary bearing a CL dramatically increases from estrus to mid-cycle (diestrus) in ewes (Niswender et al., 1975), cattle (Herzog et al., 2010) and other species (Miyazaki et al., 1998) followed by a decrease at the end of the estrous cycle (Siqueira et al., 2019). Besides the regular pattern of increase-plateau-decrease blood perfusion during CL development in the estrous cycle, studies have also demonstrated a progressive increase in CLBP in pregnant females (Herzog et al., 2011; Siqueira et al., 2019) perhaps as a consequence of the presence of the conceptus and the secretion of luteotropic factors.

If conception fails, luteolysis takes places and is driven by uterus-borne luteolysins, primarily prostaglandin $F_{2\alpha}$ (Niswender et al., 2000). Some authors have divided luteolysis into two main events: functional luteolysis (loss of function) and structural luteolysis (luteal tissue physical regression). First, the drop in CLBP (Siqueira et al., 2019) almost immediately suppresses P4 production and secretion. Then, luteal cells go into apoptosis, followed by necrosis and tissue remodeling (Pate, 1994). These two major events of the luteolysis process occur at different timepoints, i.e., there is a temporal difference between loss of function (reduction in circulating P4) and CL physical regression (reduction in size) (Siqueira et al., 2009a; 2019). Therefore, CLBP is highly correlated with plasma P4 concentrations, whereas correlations between area of luteal tissue and plasma P4 were not as high during static and regression phases (Herzog et al., 2010). Likewise, circulating P4 is correlated to blood flow to the ovary bearing a CL in cattle (Herzog et al., 2010).

There is strong evidence to support the idea that higher CLBP is positively correlated with an increased odd of successful pregnancy establishment. In a study on vascular and morphological features of the bovine CL, Siqueira et al. (2019) reported a progressive and consistently greater CLBP from day 16 to day 20 after timed-artificial insemination (**TAI**) in pregnant compared with non-pregnant females. Area of luteal tissue, however, only differed between pregnant and non-pregnant on day 20, at the very end of a normal estrous cycle length. Likewise, other CL characteristics such as circulating P4 and CL echotexture were not good predictors of the odds of getting pregnant. A progressive increase in CLBP

(Herzog et al., 2011) and uterine blood flow in the first weeks of pregnancy (Honnens et al., 2008) have also been previously reported and the latter might be indirectly involved in the increased blood perfusion of the CL-bearing ovary.

Interrelationships among circulating progesterone, luteal tissue area, echotexture, and blood perfusion

The CL development and capacity to produce and secrete P4 rely on the amount of steroidogenic luteal cells (small and large) and the vascular support to provide nutrients and precursors for steroid secretion. Therefore, luteal tissue area not surprisingly has a high, positive correlation with plasma P4, mainly during early diestrus (Niswender et al., 2000; Siqueira et al., 2009a; Scully et al., 2014). During this phase, luteogenesis and CL development are responsible for a gradual increase in P4 secretion and concentration in plasma. At mid-diestrus, CL size (luteal area) achieves its maximum values, followed by a peak in circulating P4 a few days later (Siqueira et al., 2009a).

Extensive angiogenesis and the distribution of luteal cells within the CL are sonographic visualized as a hypoechoic image pattern and changes in this pattern might reflect distinct luteal phases and function (Tom et al., 1998). In this regard, previous studies have investigated the correlations between plasma P4 and quantitative CL echotexture (defined as the patterning of echogenicity). Results were, however, rather inconsistent (Siqueira et al., 2009a; 2019). In general, it seems that pixel brightness (mean pixel value) within CL tissue has limited value for inferences about CL function (plasma P4 secretion). In contrast, the variation in pixel brightness within the luteal tissue, i.e., pixel heterogeneity, appears to be a good indicator of luteal function and has a fair-to-high correlation with plasma P4 during luteolysis (Siqueira et al., 2009a). In other words, an ultrasonic image of a heterogeneous luteal tissue is often observed in early luteal phase (metestrus) and after onset of luteolysis, reflecting the ongoing organization (metestrus) or disorganization (luteolysis) of the CL itself (luteal cells, connective tissue, and blood vessels). An ultrasound image with low pixel heterogeneity values, however, is observed during diestrus, concomitantly with a high-circulating P4 scenario, evidence of a homogeneous luteal tissue mostly covered by small and large luteal steroid-secreting cells (Niswender et al., 2000).

Use for early detection of pregnancy status

Ultrasound-based pregnancy diagnosis is usually performed by B-mode and only recommended after 28–30 days of pregnancy (Pieterse et al., 1990), as at this period, the accuracy in conceptus visualization reaches 100% (Nation et al., 2003). Yet, the detection of spontaneous CL regression by ultrasound in non-pregnant cows could allow an earlier assessment of gestational status (Pugliesi et al., 2013; Pugliesi et al., 2014; Scully et al., 2014; 2015; Siqueira et al., 2019).

Evaluation of CL size has been used with high accuracy to identify non-pregnant cattle between after day 20 of gestation (Kastelic et al., 1991), but plasma/serum P4 concentrations have a greater correlation with CLBP than CL size during the luteolytic period in ruminants (Herzog et al., 2010; Balaro et al., 2017; Rocha et al., 2019). This indicates that a decrease in CLBP occurs prior to structural luteolysis and has been observed as early as day 16 after TAI in dairy cows and heifers (Siqueira et al., 2019). Also, a considerable rate of false negative results is observed when using only CL area for detection of luteolysis in non-pregnant beef cows, as some animals have a small but functional CL for pregnancy maintenance (Pugliesi et al., 2018).

To our knowledge, the first attempt to diagnosis pregnancy by luteolysis detection using Doppler imaging was reported by Utt et al. (2009) in beef recipient cows; however, the method used to determine CLBP was time-consuming and resulted in low accuracy (Table 1). Thus, more in-depth studies during spontaneous luteolysis characterized the CLBP changes between pregnant and non-pregnant cows (Matsui and Miyamoto, 2009; Pugliesi et al., 2014). The results allowed the definition of CLBP during luteolysis and served as a basis in pioneered investigations in dairy (Siqueira et al., 2013) and beef (Pugliesi et al., 2014) for the conception of applied criteria to identify a functional or non-functional CL at early pregnancy. In dairy females, a high accuracy and negative predictive value (**NPV**) was obtained by Siqueira et al. (2013) at 20 days post-TAI using only CLBP. In beef cows, 91% accuracy and 100% NPV were obtained to determine pregnancy status on day 20 post-TAI (Pugliesi et al., 2014). Although different definitions were used to identify a non-functional CL in these studies, the criteria are similar to detect non-pregnant females and the early diagnoses were compared with the gold standard method on day 30 of pregnancy. Both methods use a subjective and real-time evaluation (Fig. 1) that is simpler and more practical than using pixels counting to determine colored area and classify the CL as functional or not (Pugliesi et al., 2018).

Because these methods do not allow visualization of the embryo, one can state that color-Doppler ultrasound technique allows the detection of luteolysis for early indirect identification/-diagnosis of non-pregnant females. Other studies (Table 1) were performed in different breeds and parity classes and confirmed a high accuracy and null or extremely low rate of false negative results using the proposed cut-offs in dairy and beef cattle. Altogether, these outcomes support that determination of CLBP is an accurate diagnosis method for detection of pregnancy status, as there is a low likelihood of incorrectly detecting a pregnant female as non-pregnant, resulting in high NPV when applied after 19 days of pregnancy.

Nonetheless, proportion of false-positive (**FP**) results (cows diagnosed as pregnant by Doppler, but actually not confirmed as pregnant by the gold standard diagnosis) is the main factor differing among the studies (Table 1). The FP results may occur due to different reasons that result in the presence of an active CL on the day of CLBP-based diagnosis. Late ovulation in timed-programs and variations in time of physiological luteolysis among breeds and parity order are possible explanations, but the greatest part to blame for FP is apparently related to the rate of early embryonic loss between the Doppler and the confirmatory diagnosis. More recently, different studies in Nelore (Dalmaso de Melo et al., 2020), *Bos taurus* beef (Holton et al. 2022a; 2022b) and Holstein (Madoz et al., 2022) females have indicated by evaluating the expression of interferon-stimulated genes in circulating immune cells and/or pregnancy-associated proteins, that at least one third of the FP results are occurring due to early embryonic loss between days 19/20 and 30–34 of pregnancy. Collectively, these results indicate that most FP results are probably a result of prolonged luteal phase rather than embryonic mortality beyond maternal recognition of pregnancy. This is supported by the rate of 10–15% of Nelore heifers and cows synchronized for TAI, but not inseminated, that did not undergo luteolysis up to 22 days after arbitrary estrus (Ataíde et al., 2021).

In addition, it is noteworthy that no significant differences in CLBP on days 20 and 22 were observed between females diagnosed as true positive and FP (Holton et al., 2022a), but CLBP and plasma P4 concentrations on day 20 were lesser in females with indicative of embryonic mortality between days 20 and 25 of pregnancy (Dalmaso de Melo et al., 2020). Also, we performed a recent analysis (unpublished; Fig. 3) which indicates that the proportion of CLBP at day 20 is negatively associated with the rate of FP results.

Table 1
Studies comparing the use of Doppler ultrasonography to detect luteal function for diagnosis of pregnancy status between day 17 and day 22 and the B-mode ultrasonography for detection of embryo after day 28 of pregnancy in beef and dairy cows and heifers.

Authors	Type/breed	Parity order	Type of service	Moment of gestation, d	Animals, n	Conception rate, %	Accuracy, %	False positive, % (total)	False negative, % (total)	PPV, %	NPV, %
Utt et al., 2009	Beef (Crossbreed)	Cows	TET	17	50	46	60	30.6	9.4	54.4	73.3
				19			68.8	24.6	6.6	61.4	82.9
				21			71.4	21	7.6	64.8	81.5
Siqueira et al., 2013	Dairy (Holstein-Gir)	Parous cows	TAI	20	317	46.1	74.6	24.6	0.7	64.8	97.7
		Heifers			209	47.4	76.6	22.7	0.6	67.2	98
Pugliesi et al., 2014	Beef (Nelore)	Parous cows	TAI	20	111	37.8	91	9	0	80.8	100
Guimarães et al., 2015	Beef (Nelore)	Parous cows	TET	21	163	43.6	88.3	11.7	0	78.9	100
Scully et al., 2014[1]	Dairy (*Bos taurus*)	Parous cows	AI after estrus	18	80	52.8	68.1	20.9	11.1	66.6	70.3
				19	80	56.8	82.4	13.5	4.1	79.5	88
				20	90	42.2	77.7	17.3	4.9	70.8	87.8
				21	94	45.2	87.1	11.8	1.1	78.8	97.5
Pugliesi et al., 2018	Beef (Nelore)	Parous cows	TAI	22	246	49.6	94.7	5.3	0	90.4	100
		Heifers			231	41.6	90	10	0	80.5	100
Ataíde et al., 2018	Beef (Nelore)	Parous cows	TET	22	221	35.5	83.8	16.2	0	68.8	100
Andrade et al., 2019	Beef (Nelore)	Heifers	TAI	21	113	–	87.8	12.2	0	77.3	100
Dalmaso de Melo et al., 2020	Beef (Nelore)	Parous cows	TAI	20	144	58	93	7	0	89	100
		Heifers			100	52	88.3	11.7	0	81.8	100
Wellert et al., 2020	Beef (Angus-cross)	Parous cows	TAI	21	84	–	–	–	0	89.4	100
		Heifers			25				0	75	100
Dubuc et al., 2020	Dairy (Holstein)	Parous cows	AI	21	1 632	22	62.1	37.5	0.4	52	98.1
Holton et al., 2022a	Beef (*Bos taurus*)	Parous cows	TAI	20	208	52.9	87	13	0	80	100
				22	209	52.6	92	8	0	85	100
Holton et al., 2022b	Beef (*Bos taurus*)	Heifers	TAI	20	183	–	90	10	0	86	100
				22		–	92	8	0	90	100
Madoz et al., 2022	Dairy (Holstein)	Parous cows	TAI	19/20	131	37.4	74.8	24.5	0.7	60	98.2
		Heifers									
Ferraz et al., 2022	Dairy (Holstein)	Parous cows	TAI	21	140	28.6	53	46.3	0.7	38	98
		Heifers			32	31.3	66	34	0	48	100

Abbreviations: PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; TET = timed-embryo transfer; TAI = timed-artificial insemination; AI = artificial insemination.
[1] This study also considered the uterine echotexture and corpus luteum size as additional criteria to the luteal blood perfusion for diagnosis of non-pregnant animals.

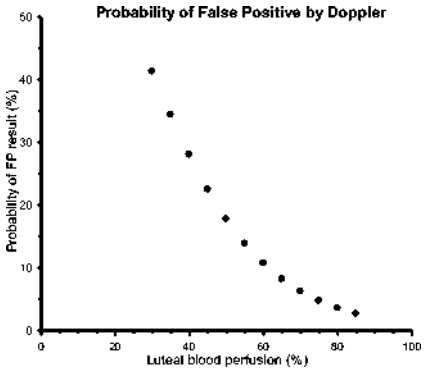


Fig. 3. Probability of false-positive result (females identified with a functional CL on day 20 post-TAI by Doppler ultrasonography, but non-pregnant on day 30) according to the CLBP at the Doppler evaluation in beef cattle (n = 159). Probability of FP = exp(−0.0591*x* + 1.4201)/1 + exp(−0.0591*x* + 1.4201); *P* = 0.008. Abbreviations: CLBP = corpus luteum blood perfusion; CL = corpus luteum; FP = false positive; TAI = timed-artificial insemination.

So, the probability to have a FP result is greater than 25% in females with ≤40% of CLBP, and less than 5% in females with ≥75% of CLBP at time of pregnancy diagnosis.

By comparing the results related to accuracy in the different studies (Table 1), it is possible to observe a greater FP rate and lesser positive predictive value and accuracy in dairy compared with beef cattle, in which pregnancy losses are normally lower, but other factors may be also involved as moment of ovulation after TAI and time of luteolysis (Reese et al., 2020). On the other hand, an influence of parity (nulliparous vs multiparous) on FP rate seems to occur only in beef animals. In dairy, FP rates did not differ between lactating cows and heifers (Siqueira et al., 2013; Ferraz et al., 2022) whereas in beef, studies (Dalmaso de Melo et al., 2020; Holton et al., 2022a) reported increased FP rate and reduced accuracy in heifers compared with suckled cows. At least in *Bos indicus* beef animals, this difference is probably caused by a postponed spontaneous luteolysis in Nelore heifers than in suckled cows (Ataíde et al., 2021).

Although there are well-known intrinsic differences in ovarian physiology between *B. indicus* and *B. taurus* females (Sartori et al., 2016), the accuracies of pregnancy diagnosis by Doppler on days 20 and 22 post-TAI in *Bos taurus* beef cattle (87 and 92%, respectively; Holton et al., 2022a), were similar to those observed in *B. indicus* (Dalmaso de Melo et al., 2020). Finally, it is important to note that the accuracy increases over time after service (Pugliesi et al., 2014; Scully et al., 2015; Siqueira et al., 2019), mainly because a greater proportion of non-pregnant cows are detected around luteolysis. In this regard, Holton et al. (2022a) reported a 40% reduction in FP rate when the diagnosis was performed on day 22 compared with day 20 post-TAI in beef cows. In general, studies have indicated that non-pregnancy diagnosis based on CLBF is a feasible and accurate method only when performed after day 20 of pregnancy in cattle.

In small ruminants, the subjective CLBP assessment using color-Doppler ultrasonography to distinguish pregnant and non-pregnant animals also resulted in high accuracy (>85%) and 100% of NPV (Arashiro et al., 2018; Cosentino et al., 2018). In goats, Cosentino et al. (2018) demonstrated that pregnancy diagnosis could be accurately performed beginning 21 days postbreeding. In ewes, the luteolytic period is earlier than goats and cows, and subjective CLBP assessment was considered a highly efficient method as early as 17 days after breeding (Arashiro et al., 2018).

In most studies, inferences about CL functional status and prediction of non-pregnancy were based on the quantification of the colored area within the CL Doppler image. In this regard, differences in settings of the ultrasound device that changes the amount of signal displayed as colored pixels can potentially affect accuracy of a given exam by increasing the proportion of FP or FN. During B-mode ultrasonography, most settings (transducer frequency, overall gain, gray-scale curve) can be intuitively adjusted by an experienced examiner to obtain a clear image. Moreover, although echotexture attributes such as mean pixel value or pixel heterogeneity can be used to evaluate the CL (Siqueira et al., 2009a), in routine gynecologic exams, most inferences on CL function are based only on its presence or size (area or diameter). Thus, small differences in B-mode image settings are less likely to interfere on the interpretation of scanning.

On the other hand, changes in color-Doppler settings might have a deeper impact on exam accuracy. The pulse repetition frequency (**PRF**) is of particular importance, as it defines the capacity of the device to display the Doppler signal. The higher the PRF, the lesser the signal displayed as colored areas in the image (Fig. 4). Yet, the use of a very low PRF (and thus set to a high sensitivity scenario) may increase the chance of occurring flash artifacts due to minor movements during scanning, such as those caused by breathing (Fig. 5).

In a recent study (unpublished data), we scanned cows 20 days after TAI and recorded three images of each CL using PRF values of 0.7, 1.0, and 1.5 KHz, respectively. The stored images were later used to predict non-pregnant status by a second evaluator who was blinded of the differences in PRF and the fact that more than one image referred to the same cow. Results were compared to those of pregnancy diagnosis at day 30, as previously described (Siqueira et al., 2013). As expected, reducing PRF from 1.0 to 0.7 KHz (and thus increasing the colored area in the image) decreased PPV and specificity (79.2 and 72.2% vs 67.9 and 50.0%, respectively), whereas increasing PRF from 1.0 to 1.4 KHz decreased NPV and sensitivity (100 and 100% vs 81.3 and 84.2%, respectively). These results demonstrate that minor differences on Doppler settings may lead to image misinterpretation and, thus, the accuracy of non-pregnancy diagnosis based on color-Doppler evaluation of

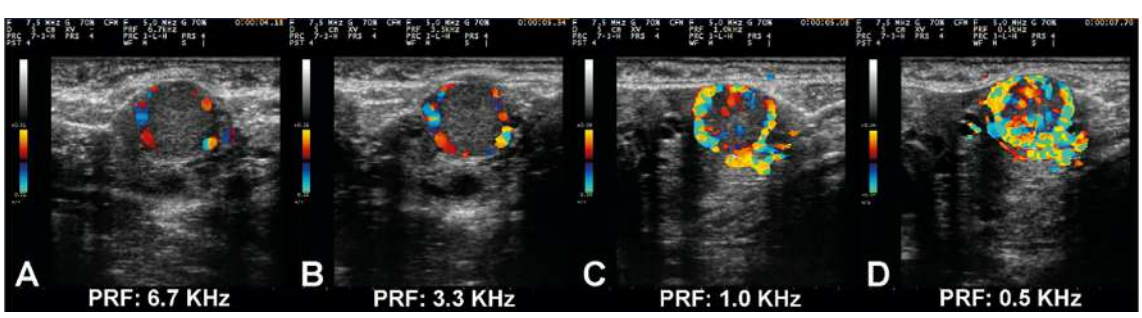


Fig. 4. (A–D) Color-Doppler images of the same bovine CL generated using decreasing PRF values. (A) PRF set at 6.7 KHz, (B) PRF set at 3.3 KHz, (C) PRF set at 1.0 KHz, (D) PRF set at 0.5KHz. Abbreviations: CL = corpus luteum; PRF = pulse repetition frequency.

Fig. 5. (A–C) Effect of movement during acquisition of an image of a bovine CL using color-Doppler set to low (0.5 KHz) PRF value. (A) Image without flash artifacts, (B) Image with minor artifacts, (C) Image with major artifacts. Abbreviations: CL = corpus luteum; PRF = pulse repetition frequency.

CLBP requires the use of consistent standard settings throughout exams.

Application in fixed-time programs in cattle

Resynchronization protocols provide a chance for a second round of TAI or timed-embryo transfer (**TET**) and may increase the reproductive efficiency of beef and dairy cattle (Baruselli et al., 2017). Due to the high efficiency of detecting non-pregnant females earlier by using Doppler imaging, new resynchronization protocols for the anticipation of the second TAI or TET were developed (Pugliesi et al., 2018). Therefore, it is possible to perform two TAIs or TETs within 22–24 days compared with 40 or 32 days when using the conventional or early resynchronization protocols, respectively (Fig. 6). For this, the so-called super-early resynchronization protocols must begin in all females between 12 and 18 days after TAI or estrus, regardless of gestational status. Alternatively, CLBP evaluation can be performed to resynchronize only females without an active CL. In this regard, (Guimarães et al., 2015) performed the detection of non-pregnant recipients by Doppler on day 21 after previous estrus (14 days after TET) and obtained 79.3% of non-pregnant animals resynchronized earlier than the conventional management.

The onset of the super-early resynchronization protocol may vary according to the time of Doppler exam and duration of the protocol, but it usually precedes the period of maternal recognition of pregnancy (days 12–17 after estrus). Thus, the association of drugs used for these protocols must not jeopardize the ongoing pregnancy. Considering that estradiol is involved in CL regression (Araujo et al., 2009), administration of exogenous estradiol esters in the second week of pregnancy is controversial. Initial studies comparing the use of estradiol to resynchronize bovine females from the second week postbreeding had varying results according to parity, type (dairy or beef), breed, dose, and time of treatment (El-Zarkouny and Stevenson, 2004; Colazo et al., 2006; Machado et al., 2008). In the first study to evaluate the association of super-early resynchronization and Doppler diagnosis, a negative effect on pregnancy rate was observed in cows receiving 1.5 mg estradiol benzoate (**EB**) on day 13 post-TAI (Vieira et al., 2014). On the other hand, negative effects on pregnancy rates were not

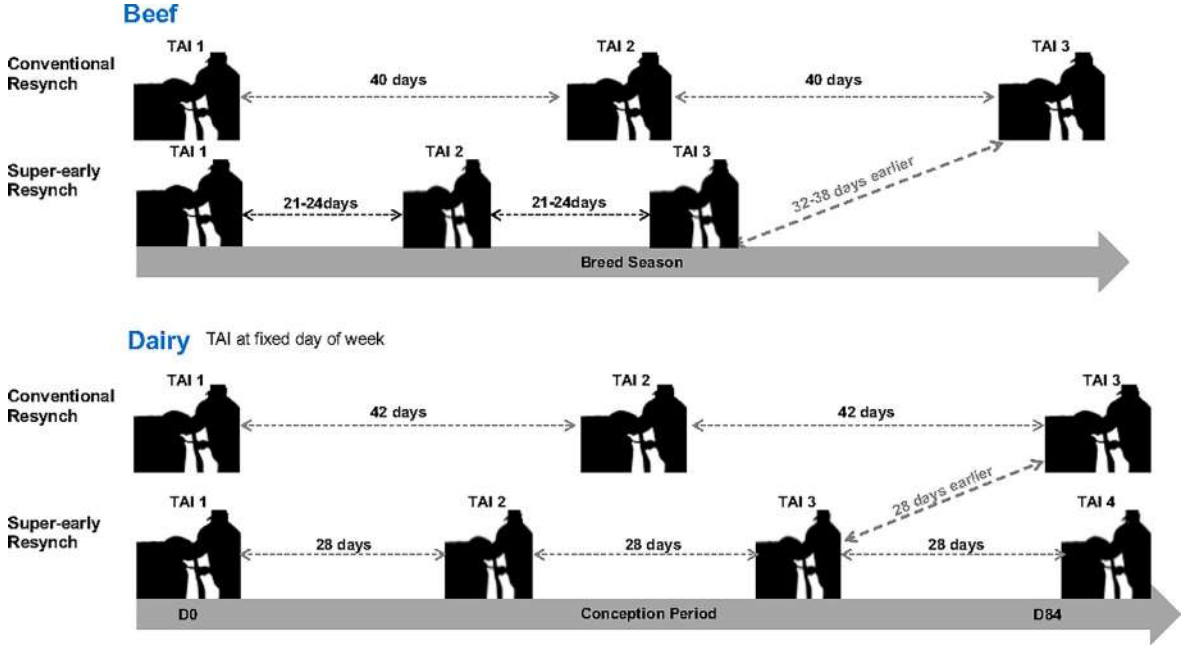


Fig. 6. Schematic illustration of the super-early resynchronization strategy compared to the conventional resynchronization in TAI programs in beef and dairy cattle. In dairy, the TAI is usually performed on the same day of week. Super-early resynchronization may start 12–15 days after TAI in beef and 17–19 days after TAI in dairy, resulting in an interval between TAIs of 21–24 days in beef and 28 days in dairy cattle. Conventional resynchronization is performed after pregnancy diagnosis on days 28–32 of pregnancy, resulting in an interval of 40–42 days in beef and dairy herds. Abbreviations: TAI = timed-artificial insemination; Resynch = resynchronization.

observed when EB treatment (1 mg) was administered 13 days after first TAI in beef cows (Stevenson et al., 2003) or lactating dairy cattle (El-Zarkouny and Stevenson, 2004). Therefore, our group and others have been dedicated to develop different strategies for super-early resynchronization protocols without using EB or limiting its use to a maximal dose of 1 mg.

In beef cattle, initial studies were carried out in heifers to evaluate the use of 1 mg EB (Motta et al., 2020) and to compare with the administration of injectable P4 (Vieira et al., 2021) in the resynchronization protocols initiated 14 days after TAI. In both studies, the Doppler diagnosis for evaluation of CLBP was performed on Day 22 and heifers diagnosed as non-pregnant were re-inseminated on Day 24 after first TAI. Although Motta et al. (2020) reported that the additional treatment with estradiol or EB associated with a P4 device anticipated luteolysis in non-pregnant heifers, no difference was observed in pregnancy rates from first TAI among experimental groups. This indicated that there is no harmful effect on the pre-existing pregnancy when using 1 mg EB or estradiol in *Bos indicus* and crossbred heifers. In fact, the additional treatment with 1 mg EB 14 days post-TAI resulted in greater pregnancy rates (Motta et al., 2020; Vieira et al., 2021). Vieira et al., (2021) compared pregnancy rates in beef heifers resynchronized 14 days after the first TAI using a P4 intravaginal device associated with either long-acting P4 or 1 mg EB, and observed that the EB treatment resulted in greater resynchronization pregnancy rates than injectable P4 treatment.

In agreement with what has been observed for beef heifers, Palhão et al. (2020) reported that the use of 1 mg EB to resynchronize suckled beef cows on Day 13 post-TAI did not compromise pregnancy rate to first TAI. However, Silva et al. (2022) compared the use of 1 or 2 mg EB 14 days after TAI and reported a reduction in pregnancy rate at first TAI in *Bos indicus* beef cows resynchronized with 2 mg EB. Furthermore, cows receiving 2 mg EB had a two-fold greater risk of early pregnancy loss compared with cows that received 1 mg EB. Together, these studies indicate that the use of 1 mg EB associated with a P4 device is safe and efficient for super-early resynchronization of beef heifers and suckled beef cows.

Because of the controversial results of the first studies using estradiol or EB, alternatives were also concomitant investigated. Thus, considering that high plasma P4 concentrations have a potential inhibiting effect on the growth of luteinizing hormone- and follicle-stimulating hormone-dependent follicles in cattle (Cavalieri, 2018), the effects of short-acting or long-acting injectable P4 at different doses have been evaluated for super-early resynchronization in heifers and cows (Pugliesi et al., 2019a; Ataíde et al., 2021). Studies comparing the use or not of the additional treatment with injectable P4 at doses greater than 75 mg indicated a positive effect on conception rates of resynchronized beef cows and heifers (Pugliesi et al., 2019a; Ataíde et al., 2021). In Pugliesi et al. (2019a), the interval between the first and second TAI was only 22 days and resulted in a 75% pregnancy rate after two TAIs. In Ataíde et al. (2018), Nelore beef females were submitted to two consecutive resynchronizations, allowing three TAIs in 48 days, and the cumulative pregnancy rate reached 83.3%. Thus, the treatment with injectable P4 in its different presentations for super-early resynchronization offers the potential to increase pregnancy outcomes.

In *Bos indicus* beef cattle, where postpartum anestrous is a great issue, super-early resynchronization may have a greater impact on reproductive performance compared to *Bos taurus* beef breeds. The implementation of super-early resynchronization protocols has the potential to increase the number of cows becoming pregnant within the first month of the breeding season, as it allows for two services (TAI or TET) at 21- to 24-day intervals. In this regard, Ojeda-Rojas et al. (2021) compared using a simulation model different types of resynchronization strategies in *Bos indicus* beef cattle and reported that the scenario of two TAIs within a 24-day interval represents the reproductive program with the best technical performance. Moreover, three TAIs at a 24-day interval lead to a greater number of births early in the calving season and heavier calves at weaning, when compared with only natural mating or other resynchronization strategies (Ojeda-Rojas et al., 2021). Considering that this result was based on a model rather than an actual controlled study, further studies for investigation of impact of super-early resynchronization on the calving distribution are encouraged. In a preliminary study using controlled data (unpublished) obtained from two consecutive breeding seasons with the same group of Nelore females, we have also observed an earlier calving after using three TAIs at a 24-day interval. A 43% increase in births at the first month of calving season (218 vs 152 births) and 9% increase in total number of calves born (394 vs 361 calves) were observed after the super-early resynchronization was adopted compared to previous season using only TAI and cleanup bulls. In addition, a retrospective analysis in order to evaluate calving distribution indicated that calves born in the first three weeks of birth season were ~22 kg heavier than those born in the last three weeks.

In dairy cattle, investigations on super-early resynchronization protocols have been scarcer when compared with beef cattle. One of the factors that contributes for the reduced number of studies in dairy and the application of these protocols is the fit of a Doppler diagnosis into the schedule of weekly reproductive management visits by the veterinarian in dairy operations (Fig. 6). Another factor to be considered for the development of resynchronization protocols for dairy cattle was the greater proportion of FP results reported in all studies, mainly for lactating dairy cows (Siqueira et al., 2013). Nevertheless, a recent study by our group (Neto et al., 2022) reported that starting resynchronization 17 days after TAI increases pregnancy rate within the first 84 days after the end of the voluntary waiting period compared, with the traditional resynchronization starting 31 days after TAI in dairy cows. Also, the use of 1 mg EB associated with a P4 device at the onset of the protocol did not impact pregnancy from first TAI and reduces by half the proportion of FP results (cows with functional CL at 24 days after previous TAI). The association of a low EB dose given at a later timepoint relative to the period of maternal recognition of pregnancy, as performed by Neto et al. (2022) and Freitas et al. (2022) on 17–19 days after TAI, may have an even lower risk to harm a pre-existing pregnancy due to greater conceptus' signaling to maintain the CL active at this period. In countries where estradiol drugs are not allowed, the super-early resynchronization can be performed using only the P4 device or the P4 device associated to injectable P4 (if allowed), but conception rates are approximately 12% less when EB or injectable P4 is not used to synchronize follicular wave emergence.

Use of Doppler for recipient selection

A correct selection of eligible recipients is one of the leading objectives for an embryo transfer program in cattle. Among the several characteristics of the reproductive tract, the presence of an evident, active CL is considered one of the most important factors to determine whether a healthy recipient should be used to reach a high likelihood of pregnancy (Phillips and Jahnke, 2016). Usually, luteal size is assessed by palpation or by gray-scale ultrasonography per rectum and a larger CL is preferable over a smaller CL. Picking recipients founded only on CL size may result in transfer of embryos to recipients with a non-adequate uterine environment associated to less functional CL (Pinaffi et al., 2015).

Indeed, a pioneered study in cattle (Pinaffi et al., 2015) classifying recipient cows as having low (≤40%) or high (>40%) CLBP at the time of embryo transfer (day 7) indicated a significant greater pregnancy rate in those with high CLBP compared with low CLBP (48% vs 0%). In agreement, CLBP on the day of embryo transfer was greater in pregnant than non-pregnant Holstein recipients (Kanazawa et al., 2016). But, the CLBP was determined in this later report based on the area of CLBP and the time-averaged maximum velocity at the base of the spiral artery, which have low applicability in large-scale operations since they are time-consuming.

In this regard, we have studied (Pugliesi et al., 2019b) the association between CL characteristics assessed by ultrasonography at the time of embryo transfer and pregnancy rate in beef recipients, using real-time evaluations to determine CLBP. In this study, we used the two most practical approaches to subjectively evaluate CLBP (i.e., estimation of the proportion of tissue with colored signals [0–100%] and a scoring system (depicted in Fig. 1)). Thus, beef recipients (n = 444) were retrospectively divided into three subgroups according to CL area and three subgroups based on CLBP [low (≤40%), medium (45–50%) or high (≥55%)]. Results indicated that CLBP determined by color-Doppler ultrasonography was the most important factor evaluated at embryo transfer that affected pregnancy outcome. Our results demonstrated a positive and linear association between the proportion of CLBP and pregnancy outcomes in synchronized beef recipients. Latter studies (Aragon et al., 2018; Munhoz et al., 2018; Silva et al., 2018) have also evaluated CLBP using different real-time criteria. Although not significant, pregnancy rates per embryo transfer in recipients classified as presenting high/excellent CLBP were approximately 1.26–2.33-fold greater compared with those females with low/bad CLBP in Holstein cows (42 vs 18%; Aragon et al., 2018), Holstein-Gir cows and heifers (51.8 vs 33%; Munhoz et al., 2018) and Angus heifers (60.6 vs 48.1%; Silva et al., 2018).

Consistent with the results in cattle, our group (Morelli et al., 2022) recently detected that CLBP in recipient mares was the only luteal sonographic characteristic that affected pregnancy establishment after transfer of *in vivo* equine embryos (low CLBP: 65.5% [38/58] vs high CLBP: 88.4% [38/43]). This also reflected a progressive increase in the pregnancy rate associated with increased CLBP. In addition, in buffalo, pregnancy rates were 2.5-fold greater in recipients with high CLBP (≥50%) than those with low CLBP (<50%) at the time of embryo transfer (Silva et al., 2018). This indicated that CLBP could be used as a main criterion to select highly receptive recipients for different large animal species.

Considering that the number of recipients at the time of embryo transfer in fixed-time programs in cattle is limited and usually lesser than the number of embryos, one strategy for using Doppler in recipient selection is rejecting females with a non-functional yet palpable CL. This represented 9.5% of the females bearing a CL at time of embryo transfer (Pugliesi et al., 2019b). In addition, if an excessive number of recipients were available, CLBP evaluation could be used to prioritize the transfer of embryos only into recipients with medium or high CLBP (>40%). Consequently, embryos would not be transferred to females with a non- or sub-functional CL identified by Doppler imaging (Pugliesi et al., 2019b). Alternatively, embryos of high generic merit could be rather transferred in recipients ranked by high CLBP.

Although all the studies have been pointing to the same positive effect of CLBP on pregnancy rates in recipients, the mechanisms associated with this effect to favor pregnancy establishment are still not fully understood. The hypothesis that high CLBP could be associated with embryotropic effects of circulating P4 during embryo development seems not to be supported by results of recent studies, because correlations with circulating P4 are weak for CLBP and moderate or strong for luteal size at early diestrus (Rocha et al., 2019). In addition, Siqueira et al. (2009a and 2009b) and Chagas e Silva et al. (2002) observed that circulating P4 concentrations on the day of embryo transfer are of limited practical use for recipient selection in dairy and beef cattle. Alternatively, an increased CLBP could be associated with a greater resistance of the CL to undergo regression or with a greater vascularization to the reproductive tract. These alternative hypotheses, however, still remain to be investigated in further studies for a better understanding of the mechanisms involved in the positive effects of CLBP on pregnancy establishment in cattle.

Final considerations

Along the last decades, the cumulative knowledge about CLBP determined by color-Doppler ultrasonography indicated that this luteal characteristic is a practical and real-time tool to evaluate CL function. Based on the high correlations between circulating P4 vs CLBP compared with P4 vs CL size, the evaluation of CLBP during the phase of luteal regression has been used to anticipate the detection of non-pregnant cattle in TAI and TET programs. Several studies have used a subjective and real-time evaluation of CLBP in beef and dairy cattle. This method has shown a high accuracy and low or near to zero false negative results and, consequently, very high NPV. In beef females, when the diagnosis is performed 20–22 days post-TAI, the accuracy compared with the gold standard diagnosis on the 30th day of gestation exceeded 90%.

Although CLBP assessment can detect non-pregnant females, CL function is not a specific biomarker of pregnancy; therefore, a considerable percentage of false-positive results (12–30%) may occur, mainly in dairy cows and heifers. The detection of non-pregnancy by evaluation of CLBP earlier than the conventional methods (visualization of embryo and heartbeat) allowed for the development of new strategies of resynchronization of ovulation in a super-early manner, resulting in the possibility of two services (TAI or TET) within a 22- to 24-day interval. It is worth mentioning that such methods to evaluate CLBP and their practical applications boosted the commercial use of Doppler ultrasound for early detection of non-pregnant bovine females in an unprecedented and pioneering way in South America, mainly in Brazil. Finally, a greater CLBP at the day of embryo transfer in prospective pregnant females and other findings indicating that CLBP may be a better indicator of luteal activity in studies in cattle and horses suggest that evaluation of CLBP at embryo transfer is a more valuable information to estimate the probability of pregnancy success than systemic P4 concentrations in embryo recipients. It is noteworthy, however, that in order to obtain these great advances, training and understanding of the imaging principles and equipment is required, because the device's settings must be properly regulated and the operator very well prepared to carry out the assessments correctly.

Ethics approval

The authors did not use any live animal to conduct this review.

Data and model availability statement

Data or models were not deposited in an official repository. No new datasets were created.

Author ORCIDs

Guilherme Pugliesi: https://orcid.org/0000-0001-5739-0677.
Amanda Guimarães Silva: https://orcid.org/0000-0003-0918-4208.
Joao H. M. Viana: https://orcid.org/0000-0002-3742-2368.

Luiz Gustavo B. Siqueira: https://orcid.org/0000-0002-2800-5829.

Author contributions

Guilherme Pugliesi: conceptualization, writing original draft, review and editing.

Amanda Guimarães Silva: writing original draft, review and editing.

Joao H. M. Viana: conceptualization, writing original draft and editing.

Luiz Gustavo B. Siqueira: conceptualization, writing original draft and editing.

Declaration of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Acknowledgements

None.

Financial support statement

This work is supported by the funding agencies: São Paulo Research Foundation (FAPESP), the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) Project 422372/2018-8, and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES).

Transparency Declaration

This article is part of a supplement entitled Keynote lectures from the 11th International Ruminant Reproduction Symposium supported by the British Society of Animal Science.

References

Acosta, T.J., Miyamoto, A., 2004. Vascular control of ovarian function: Ovulation, corpus luteum formation and regression. Animal Reproduction Science 82–83, 127–140. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.022.

Andrade, J.P.N., Andrade, F.S., Guerson, Y.B., Domingues, R.R., Gomez-León, V.E., Cunha, T.O., Jacob, J.C.F., Sales, J.N., Martins, J.P.N., Mello, M.R.B., 2019. Early pregnancy diagnosis at 21 days post artificial insemination using corpus luteum vascular perfusion compared to corpus luteum diameter and/or echogenicity in Nelore heifers. Animal Reproduction Science 209,. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106144 106144.

Aragon, F.A.L.F., Rezende, R.G., Soriano, S., Sica, A.F., Abreu, L., Mingoti, R., Elliff, F.M., Zanatta, G., Baruselli, P.S., 2018. Factors that affect the conception rate to FTET of Holstein recipients evaluated by Color Doppler ultrasound. Animal Reproduction (Abstract) 15, 351.

Arashiro, E.K.N., Palhao, M.P., Santos, J.R.L., Fontes, R.C., Siqueira, L.G.B., Henry, M., Viana, J.H.M., 2013. Three-dimensional modeling of color Doppler images: a new approach to study follicular vascularization in cattle. Animal Reproduction 10, 662–669.

Arashiro, E.K.N., Ungerfeld, R., Clariget, R.P., Pinto, P.H.N., Balaro, M.F.A., Bragança, G. M., Ribeiro, L.S., da Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., 2018. Early pregnancy diagnosis in ewes by subjective assessment of luteal vascularisation using colour Doppler ultrasonography. Theriogenology 106, 247–252. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.029.

Araujo, R.R., Ginther, O.J., Ferreira, J.C., Palhão, M.M., Beg, M.A., Wiltbank, M.C., 2009. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. Biology of Reproduction 81, 426–437. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073825.

Ataíde, G.A., Pellegrino, C.A.G., Claro Jr, I., Meneghetti, M., Grázia, J.G., Góis, A.C.N., Gonçalves, F., Torres, F., Vasconcelos, J.L.M., Pugliesi, G., 2018. Eficácia da Ultrassonografia Doppler para detecção de não prenhez em vacas de corte receptoras. In: Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), August 16th to 18th, 2018, Florianópolis, SC, Brazil, pp. 177–178.

Ataíde, G.A., Kloster, A., Moraes, É.G., Motta, I.G., Junior, I.C., Vasconcelos, L.M., Assis, P., Paula, G.D., Pugliesi, G., 2021. Early resynchronization of follicular wave emergence among Nelore cattle using injectable and intravaginal progesterone for three timed artificial inseminations. Animal Reproduction Science 229,. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106759 106759.

Balaro, M.F.A., Santos, A.S., Moura, L.F.G.M., Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., 2017. Luteal dynamic and functionality assessment in dairy goats by luteal blood flow, luteal biometry, and hormonal assay. Theriogenology 95, 118–126. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.02.021.

Baruselli, P.S., Ferreira, R.M., Colli, M.H.A., Elliff, F.M., Sá Filho, M.F., Vieira, L., Freitas, B.G., 2017. Timed artificial insemination: Current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. Animal Reproduction 14, 558–571. https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR999.

Bollwein, H., Heppelmann, M., Lüttgenau, J., 2016. Ultrasonographic Doppler Use for Female Reproduction Management. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice 32, 149–164. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2015.09.005.

Cavalieri, J., 2018. Effect of treatment of Bos indicus heifers with progesterone 0, 3 and 6 days after follicular aspiration on follicular dynamics and the timing of oestrus and ovulation. Animal Reproduction Science 193, 9–18. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.026.

Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Robalo Silva, J., 2002. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. Theriogenology 58, 51–59. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00906-8.

Colazo, M.G., Kastelic, J.P., Mainar-Jaime, R.C., Gavaga, Q.A., Whittaker, P.R., Small, J. A., Martinez, M.F., Wilde, R.E., Veira, D.M., Mapletoft, R.J., 2006. Resynchronization of previously timed-inseminated beef heifers with progestins. Theriogenology 65, 557–572. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.06.001.

Cosentino, I.O., Balaro, M.F.A., Leal, F.S.C., da Silva Carvalho, A.B., Cortat de Souza, P.R., Arashiro, E.K.N., Brandão, F.Z., 2018. Accuracy of assessment of luteal morphology and luteal blood flow for prediction of early pregnancy in goats. Theriogenology 121, 104–111. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.007.

Dalmaso de Melo, G., Mello, B.P., Ferreira, C.A., Souto Godoy Filho, C.A., Rocha, C.C., Silva, A.G., Reese, S.T., Madureira, E.H., Pohler, K.G., Pugliesi, G., 2020. Applied use of interferon-tau stimulated genes expression in polymorphonuclear cells to detect pregnancy compared to other early predictors in beef cattle. Theriogenology 152, 94–105. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.001.

Dubuc, J., Houle, J., Rousseau, M., Roy, J.P., Buczinski, S., 2020. Short communication: Accuracy of corpus luteum color flow Doppler ultrasonography to diagnose nonpregnancy in dairy cows on day 21 after insemination. Journal of Dairy Science 103, 2019–2023. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17234.

El-Zarkouny, S.Z., Stevenson, J.S., 2004. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. Journal of Dairy Science 87, 3306–3321. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73467-0.

Ferraz, P.A., Poit, D.A.S., Neto, A.L., Luiz, F., Azrak, A.J., Carneiro, AL., Pardo, F.J.D., Pohler, K.G., Baruselli, P.S., Pugliesi, G., 2022. Determination of pregnancy loss at different moments of early gestation in dairy cattle subjected to TAI. Animal Reproduction (Abstract) 19, 22136.

Fraser, H.M., Wulff, C., 2003. Angiogenesis in the corpus luteum. Reproductive Biology and Endocrinology 1, 1–8. https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-88.

Freitas, B.G., Machado, R., Lima, B., Catussi, C., Carolina, A., Motta, I.G., 2022. Efficiency of injectable P4 or EB at the beginning of resynchronization protocol (19 days after TAI) in lactating dairy cow. Animal Reproduction (Abstract) 19, 22063.

Ginther, O.J. (Ed.), 2007. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography. Equiservices Publishing, Cross Plains, WI, USA.

Gnemmi, G.M., Maraboli, C.V.A., Gnemmi, B., Saleri, R., De Rensis, F., 2022. Use and adequacy of non-pregnancy diagnosis in cow. Which future? Reproduction in Domestic Animals 57, 45–52. https://doi.org/10.1111/rda.14206.

Guimarães, C.R.B., Oliveira, M.E., Rossi, J.R., Fernandes, C.A.C., Viana, J.H.M., Palhao, M.P., 2015. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. Theriogenology 84, 237–241. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.005.

Herzog, K., Bollwein, H., 2007. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. Reproduction in Domestic Animals 42, 51–58. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00903.x.

Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H., 2010. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. Theriogenology 73, 691–697. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.016.

Herzog, K., Voss, C., Kastelic, J.P., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H., 2011. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. Theriogenology 75, 549–554. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.024.

Holton, M.P., Dalmaso, G., Dias, N.W., Pancini, S., Lamb, G.C., Pohler, K.G., et al., 2022a. Early pregnancy diagnosis in Bos taurus beef replacement heifers using color Doppler ultrasonography. Journal of Animal Science 100, 12. https://doi.org/10.1093/jas/skac028.023.

Holton, M.P., Oosthuizen, N., de Melo, G.D., Davis, D.B., Stewart Jr., R.L., Pohler, K.G., Lamb, G.C., Fontes, P.L.P., 2022b. Luteal color doppler ultrasonography and pregnancy-associated glycoproteins as early pregnancy diagnostic tools and predictors of pregnancy loss in Bos taurus postpartum beef cows. Journal of Animal Science 100, 1–9. https://doi.org/10.1093/jas/skac018.

Honnens, A., Voss, C., Herzog, K., Niemann, H., Rath, D., Bollwein, H., 2008. Uterine blood flow during the first 3 weeks of pregnancy in dairy cows. Theriogenology 70, 1048–1056. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.022.

Kanazawa, T., Seki, M., Ishiyama, K., Kubo, T., Kaneda, Y., Sakaguchi, M., Izaike, Y., Takahashi, T., 2016. Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows. Theriogenology 86, 1436–1444. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.001.

Kastelic, J.P., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1991. Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on Days 10 to 22 in heifers. Theriogenology 35, 569–581. https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90453-K.

Lonergan, P., 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. Theriogenology 76, 1594–1601. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.012.

Macchiarelli, G., Nottola, S.A., Picucci, K., Stallone, T., Motta, P.M., 1998. The microvasculature of the corpus luteum in pregnant rabbit. A scanning electron microscopy study of corrosion casts. Italian Journal of Anatomy and Embryology 103, 191–202 http://europepmc.org/abstract/MED/11315950.

Machado, R., Bergamaschi, M.A.C.M., Barbosa, R.T., Madureira, E.H., Alencar, M.M., Binelli, M., 2008. Taxas de serviço, concepção e prenhez de vacas nelore tratadas com gonadotrofina coriônica humana e 17beta-estradiol após a inseminação artificial em tempo fixo. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 45, 221. https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2008.266700.

Madoz, L.V., Lorenti, S.N., Rearte, R., Quintero-Rodriguez, L., Migliorisi, A.L., Jaureguiberry, M., Gabler, C., Drillich, M., de la Sota, R.L., 2022. Detection of nonpregnant cows and potential embryo losses by color Doppler ultrasound and interferon-stimulated gene expression in grazing dairy cows. Journal of Dairy Science 105, 6973–6984. https://doi.org/10.3168/jds.2021-21171.

Mann, G.E., Lamming, G.E., 1995. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. Journal of Reproduction and Fertility 104, 1–5.

Matsui, M., Miyamoto, A., 2009. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. The Veterinary Journal 181, 232–240. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.027.

Miyazaki, T., Tanaka, M., Miyakoshi, K., Minegishi, K., Kasai, K., Yoshimura, Y., 1998. Power and colour Doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human corpus luteum. Human Reproduction 13, 2836–2841. https://doi.org/10.1093/humrep/13.10.2836.

Morelli, K.G., Lourenço, G.G., Marangon, V.R., Oshiro, T.S.I., Silva, I.V.R., Schmidek, A., Resende, F.D., Pugliesi, G., 2022. Does Doppler ultrasonography for recipient selection improves the pregnancy success in equine embryo transfer programs? Animal Reproduction (Abstract) 19, 22081.

Motta, I.G., Rocha, C.C., Bisinotto, D.Z., Melo, G.D., Ataide Júnior, G.A., Silva, A.G., Gonzaga, V.H.G., Santos, J.A., Freitas, B.G., Lemes, K.M., Madureira, E.H., Pugliesi, G., 2020. Increased pregnancy rate in beef heifers resynchronized with estradiol at 14 days after TAI. Theriogenology 147, 62–70. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.009.

Munhoz, A.K., Pereira, M.H.C., Vasconcelos, J.L.M., 2018. Conception rate according to corpus luteum vascularization in embryo recepients cows and heifers. Animal Reproduction (Abstract) 15, 342.

Nation, D.P., Malmo, J., Davis, G.M., Macmillan, K.L., 2003. Ultrasonography at 28 to 35 days after insemination. Australian Veterinary Journal 81, 63–65.

Neto, A.L., Bisinotto, D.Z., Poit, D.A.S., Ferraz, P.A., Silva, F.M., Ferreira, W.D.A., Azrak, A.J., Pugliesi, G., 2022. Impacts on pregnancy outcomes of anticipating resynchronization of ovulation by early detection of non- pregnant dairy cows. Animal Reproduction (Abstract) 19, 22053.

Niswender, G.D., Nett, T.M., Diekman, M.A.A., Fort, C., State, P., 1975. Flow of blood to the ovaries of ewes throughout estrous cycle. Biology of Reproduction 13, 381–388.

Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiological Reviews 80, 1–29. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1.

Ojeda-Rojas, O.A., Gonella-Diaza, A.M., Bustos-Coral, D., Sartorello, G.L., Reijers, T.S. S.S., Pugliesi, G., Zerlotti Mercadante, M.E., de Lima, C.G., Gameiro, A.H., 2021. An agent-based simulation model to compare different reproductive strategies in cow-calf operations: Technical performance. Theriogenology 160, 102–115. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.035.

Palhão, M.P., Ribeiro, A.C., Martins, A.B., Guimarães, C.R.B., Alvarez, R.D., Seber, M.F., Fernandes, C.A.C., Neves, J.P., Viana, J.H.M., 2020. Early resynchronization of non-pregnant beef cows based in corpus luteum blood flow evaluation 21 days after Timed-AI. Theriogenology 146, 26–30. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.064.

Pate, J.L., 1994. Cellular components involved in luteolysis. Journal of Animal Science 72, 1884–1890. https://doi.org/10.2527/1994.7271884x.

Phillips, P.E., Jahnke, M.M., 2016. Embryo transfer (techniques, donors, and recipients). *the veterinary clinics of north america*. Food Animal Practice 32, 365–385. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.008.

Pieterse, M.C., Taverne, M.A., Kruip, T.A., Willemse, A.H., 1990. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. The Veterinary Record 126, 552–554 http://europepmc.org/abstract/MED/2368295.

Pinaffi, F.L.V., Santos, É.S., da Silva, M.G., Maturana Filho, M., Madureira, E.H., Silva, L. A., Pinaffi, F.L.V., Santos, É.S., da Silva, M.G., Maturana Filho, M., Madureira, E.H., Silva, L.A., 2015. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. Pesquisa Veterinária Brasileira 35, 470–476. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000500015.

Pugliesi, G., Pinaffi, F.L.V., Beg, M.A., Ginther, O.J., 2013. Use of corpus luteum area as a predictor of ongoing functional luteolysis in dairy heifers. Reproduction, Fertility and Development 25, 235. https://doi.org/10.1071/RDv25n1Ab173.

Pugliesi, G., Miagawa, B.T., Paiva, Y.N., França, M.R., Silva, L.A., Binelli, M., 2014. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: How early can we detect pregnancy? Biology of Reproduction 91, 1–12. https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121525.

Pugliesi, G., de Melo, G.D., Ataíde, G.A., Pellegrino, C.A.G., Silva, J.B., Rocha, C.C., Motta, I.G., Vasconcelos, J.L.M., Binelli, M., 2018. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: Feasibility and field results. Animal Reproduction 15, 239–246. https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0059.

Pugliesi, G., Bisinotto, D.Z., Mello, B.P., Lahr, F.C., Ferreira, C.A., Melo, G.D., Bastos, M. R., Madureira, E.H., 2019a. A novel strategy for resynchronization of ovulation in Nelore cows using injectable progesterone (P4) and P4 releasing devices to perform two timed inseminations within 22 days. Reproduction in Domestic Animals 54, 1149–1154. https://doi.org/10.1111/rda.13475.

Pugliesi, G., de Melo, G.D., Silva, J.B., Carvalhêdo, A.S., Lopes, E., de Siqueira Filho, E., Silva, L.A., Binelli, M., 2019b. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. Theriogenology 135, 73–79. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.006.

Reese, S.T., Franco, G.A., Poole, R.K., Hood, R., Fernadez Montero, L., Oliveira Filho, R. V., Cooke, R.F., Pohler, K.G., 2020. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. Animal Reproduction Science 212,. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106251 106251.

Rocha, C.C., Martins, T., Cardoso, B.O., Silva, L.A., Binelli, M., Pugliesi, G., 2019. Ultrasonography-accessed luteal size endpoint that most closely associates with circulating progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in beef cows. Animal Reproduction Science 201, 12–21. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.003.

Sartori, R., Gimenes, L.U., Monteiro, P.L.J., Melo, L.F., Baruselli, P.S., Bastos, M.R., 2016. Metabolic and endocrine differences between Bos taurus and Bos indicus females that impact the interaction of nutrition with reproduction. Theriogenology 86, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.016.

Scully, S., Evans, A.C.O., Duffy, P., Crowe, M.A., 2014. Characterization of follicle and CL development in beef heifers using high resolution three-dimensional ultrasonography. Theriogenology 81, 407–418. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.012.

Scully, S., Evans, A.C.O., Carter, F., Duffy, P., Lonergan, P., Crowe, M.A., 2015. Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers. Theriogenology 83, 449–458. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.009.

Silva, A.G., Nishimura, T.K., Rocha, C.C., Motta, I.G., Laurindo Neto, A., Ferraz, P.A., Bruni, G.A., Orlandi, R.E., Massoneto, J.P.M., Pugliesi, G., 2022. Comparison of estradiol benzoate doses for resynchronization of ovulation at 14 days after timed-AI in suckled beef cows. Theriogenology 184, 41–50. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.02.025.

Silva, A., Veiga, P., Castro, T., Bartolomé, J., Wallace, S.P., 2018. Color-Doppler Mode Ultrasonography for selection of Angus embryo recipients. Animal Reproduction (Abstract) 15, 371.

Silva, J.C.B., 2020. Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na produção in vitro de embriões e nas taxas de concepção utilizando embriões criopreservados. In: Proceedings of the XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), August 15th to 18th, 2018, Ilha de Comandatuba, BA, Brazil, pp. 28.

Siqueira, L.G.B., Torres, C.A.A., Amorim, L.S., Souza, E.D., Camargo, L.S.A., Fernandes, C.A.C., Viana, J.H.M., 2009a. Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. Animal Reproduction Science 115, 18–28. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.11.009.

Siqueira, L.G.B., Torres, C.A.A., Souza, E.D., Monteiro, P.L.J., Arashiro, E.K.N., Camargo, L.S.A., Fernandes, C.A.C., Viana, J.H.M., 2009b. Pregnancy rates and corpus luteum–related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. Theriogenology 72, 949–958. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.06.013.

Siqueira, L.G.B., Areas, V.S., Ghetti, A.M., Fonseca, J.F., Palhao, M.P., Fernandes, C.A.C., Viana, J.H.M., 2013. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. Journal of Dairy Science 96, 6461–6472. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6814.

Siqueira, L.G.B., Arashiro, E.K., Ghetti, A.M., Souza, E.D., Feres, L.F., Pfeifer, L.F., Fonseca, J.F., Viana, J.H., 2019. Vascular and morphological features of the corpus luteum 12 to 20 days after timed artificial insemination in dairy cattle. Journal of Dairy Science 102, 5612–5622. https://doi.org/10.3168/jds.2018-15853.

Stevenson, J.S., Johnson, S.K., Medina-Britos, M.A., Richardson-Adams, A.M., Lamb, G.C., 2003. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. Journal of Animal Science 81, 1681–1692. https://doi.org/10.2527/2003.8171681x.

Tom, J.W., Pierson, R.A., Adams, G.P., 1998. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. Theriogenology 49, 1345–1352. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00081-8.

Utt, M.D., Johnson, G.L., Beal, W.E., 2009. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. Theriogenology 71, 707–715. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.032.

Viana, J.H.M., Arashiro, E.K.N., Siqueira, L.G.B., Ghetti, A.M., Areas, V.S., Guimarães, C. R.B., 2013. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. Animal Reproduction 10, 215–222.

Vieira, C.C., Pinto, H.F., Buss, V., Gonzalez de Freitas, B., Guerreiro, B.M., Leivas, F.G., Pugliesi, G., Mesquita, F.S., 2021. Resynchronization of follicular wave using long-acting injectable progesterone or estradiol benzoate at 14 days post-TAI in Bos taurus x Bos indicus beef heifers. Theriogenology 176, 194–199. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.017.

Vieira, L.M., Sá Filho, M.F., Pugliesi, G., Guerreiro, B.M., Cristaldo, M.A., Batista, E.O.S., Freitas, B.G., Carvalho, F.J., Guimaraes, L.H.C., Baruselli, P.S., 2014. Resynchronization in dairy cows 13 days after TAI followed by pregnancy diagnosis based on corpus luteum vascularization by color doppler. Animal Reproduction (Abstract) 11, 378.

Wellert, S.R., Battista, S.E., Kieffer, J., Lurch, R.N., Garcia-Guerra, A., 2020. Comparison of different Doppler ultrasound settings for pregnancy diagnosis based on corpus luteum perfusion at 21 days after AI in beef cattle. Reproduction, Fertility and Development 32, 211. https://doi.org/10.1071/RDv32n2Ab168.

veterinary sciences

MDPI

Systematic Review

Impact of Accessory Corpus Luteum Induced by Gonadotropin-Releasing Hormone or Human Chorionic Gonadotropin on Pregnancy Rates of Dairy Cattle following Embryo Transfer: A META-Analysis

Fang Chen [1], Yi'an Hou [1], Xiaoqing Zhu [2], Cheng Mei [3], Rihong Guo [1,4,*] and Zhendan Shi [1,5,*]

[1] Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China
[2] Science and Technology Industry Development Center, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China
[3] Dongying Austasia Modern Dairy Farm Co., Ltd., Dongying 257345, China
[4] Key Laboratory of Crop and Animal Integrated Farming, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China
[5] Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base of Ministry of Science and Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China
* Correspondence: rhguo@jaas.ac.cn (R.G.); zdshi@jaas.ac.cn (Z.S.)

Simple Summary: In recent decades, embryo transfer in dairy cows has been widely applied, and improving the conception rate after embryo transfer has become a major challenge in dairy cow reproduction. Progesterone is a critical hormone during early pregnancy in the cow. One strategy to increase progesterone levels and improve the fertility of dairy cows is inducing accessory corpus luteum through the administration of GnRH or human chorionic gonadotropin after embryo transfer. Many studies tried to improve conception rate of ET recipients, but failed to deliver a clear consensus on the therapeutic benefits of such treatments. Thus, a meta-analysis to evaluate the efficacy of hCG and GnRH in improving pregnancy rates after ET was carried out in this review. Our results indicated that the use of GnRH or hCG can improve pregnancy rates in dairy recipient cows with very poor fertility (<40%), but does not have a significant effect on cows with good fertility. Compared with GnRH or GnRH analogue, hCG treatment acquired better improvement in conception rates after ET. Treatment between days 5 and 7 after synchronized ovulation was beneficial, while later than this was not. Furthermore, the treatment was more effective in parous lactating dairy cows compared with heifers. This review may have great significance in the management of reproductive performance on modern dairy farms.

check for updates

Citation: Chen, F.; Hou, Y.; Zhu, X.; Mei, C.; Guo, R.; Shi, Z. Impact of Accessory Corpus Luteum Induced by Gonadotropin-Releasing Hormone or Human Chorionic Gonadotropin on Pregnancy Rates of Dairy Cattle following Embryo Transfer: A META-Analysis. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 309. https://doi.org/10.3390/vetsci10050309

Academic Editor: Massimo Faustini

Received: 8 March 2023
Revised: 7 April 2023
Accepted: 17 April 2023
Published: 23 April 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: The circulation of progesterone (P4) concentrations of recipients has positive correlations with embryo survival and pregnancy success of embryo transfer (ET) in dairy cows. One strategy to improve P4 concentration is the administration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or human chorionic gonadotropin (hCG), thereby inducing the formation of accessory corpus luteum (CL). This study aimed at determining the efficacy of GnRH or hCG treatment regarding embryo transfer (ET) and providing a better clinical veterinary practice guidance. A meta-analysis was conducted on the data from 2048 treated recipient cows and 1546 untreated cows. By inducing the formation of accessory CL with GnRH (100 μg), GnRH analogue Buserelin (8–10 μg), or hCG (≥1500 IU) 5–11 days after synchronized ovulation, hCG alone achieved an improvement (RR = 1.39, $p < 0.05$), while GnRH and GnRH analogue did not result in significant changes (RR = 1.04, $p = 0.26$). Treatment with GnRH or hCG 5–7 days after synchronized ovulation was associated with increased chances of pregnancy compared with later treatment (11–14 days). Owing to the treatment, the pregnancy rate of cows with very poor fertility (<40%) was improved, while that of cows with good fertility (≥40%) was not affected. Treatment with GnRH or hCG greatly improved pregnancy rates of parous lactating cows (RR = 1.32, $p < 0.05$) compared with heifers (RR = 1.02, $p > 0.05$). Additionally, as indicated by pregnancy loss analysis, the treatment had no benefit on late embryo/early fetus survival at days 28–81. In conclusion, the induction of accessory CL with GnRH or hCG may benefit fertility and have important implications for the management of reproductive performance in the dairy industry.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Keywords: cow; pregnancy; embryo transfer; accessory corpus luteum

1. Introduction

In recent years, with the increase in genetic merit for milk production worldwide, the reproductive efficiency of dairy cows has declined [1,2], and it further descended by 10% in summer due to heat stress [3]. The decrease in pregnancy rates might be caused by insufficient follicle or oocyte development, which is very sensitive to environmental and physiological stresses [4,5]. To avoid the adverse effect of heat stress on oocyte development and maturation, ovulation, and early embryonic development, embryo transfer (ET) was widely adopted to facilitate fertility in dairy cows as a reproductive technology [6–9]. ET, coupled with many new biotechnics, including gene editing and somatic cell nuclear cloning, becomes a tool for genetic selection [10] and breeding [11]. Fresh or thawed blastocysts are usually transferred to recipients about 7 days after anticipated ovulation [12]. Although some groups failed to find any difference in conception rates between dairy cows of timed artificial insemination (TAI) or ET, others observed enhanced fertility with ET contrasted with TAI, because ET selects embryos based on development potential and can bypass the most critical thermosensitive periods of the oocyte or early cleavage-stage embryo [13]. Hence, by employing ET technology, the challenges caused by failure of oocyte maturation, poor embryo quality, and low tolerance to heat can be minimized, thus theoretically promoting the pregnancy rate of ET recipients compared with that of inseminated cows [14].

Early embryo mortality before implantation is another major factor that reduces pregnancy rate [15,16]. Up to 40–60% of embryos die within the first two weeks after fertilization [17–20], and the embryo loss is more severe in high-yielding cows [19,21]. Following ET, the blastocyst develops into an ovoid and then tubular form after hatching from the zona pellucida. The embryo begins to elongate on days 12–14, forming a filamentous conceptus [16]. A significant proportion of losses is likely associated with defects in the process of conceptus elongation, during which the embryo secretes interferon tau to prevent luteolysis [22]. In particular, successful pregnancies of dairy cows need sufficient progesterone, thereby stimulating endometrial secretion production. As discovered by studies, P4 secreted by CL is important throughout the pregnancy of cows [23]. Early conception failure and embryo mortality can be caused by sustained low P4 circulation between 5 and 10 days following ovulation and fertilization [24]. Thereof, endometrial secretion is conducive to embryo development and implantation [25,26]. Insufficient progesterone circulation levels are associated with unfavorable conceptus development [27], and it cannot restrain luteolytic signal development in dairy cows [28,29]. Moreover, compared with heifers, lactating dairy cows exhibited a decrease in plasma P4 levels, probably due to the increase in liver blood flow and active P4 metabolism with rising milk production [30]. Hence, increasing plasma P4 concentration could improve fertility, exclusively for lactating dairy cows.

In view of the consensus on the significance of progesterone, there are numerous studies on post-insemination progesterone supplementation [31–33]. A common strategy to improve P4 levels after AI or ET is inducement of ovulation and formation of accessory corpus luteum (CL) with gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH agonists, or human chorionic gonadotropin (hCG) when the dominant follicle (DF) of the first follicular wave is present on the ovary. Accessory CL induced by hCG during diestrus not only altered follicular and luteal dynamics, but also deferred and prolonged the luteolytic process [34]. There are several other studies [32,35,36] that give systemic reviews of the impact of progesterone (P4) supplementation or hCG and GnRH administration on the fertility of dairy cows after artificial insemination (AI), indicating an overall improvement in pregnancy rate. As reported by Yan [35], the progesterone supplementation given in the 3rd–7th days was beneficial, while that given earlier or later than this time period was

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

not beneficial. Others [36] discovered that treatment with GnRH 10 days after AI was also conducive to pregnancy after AI. However, the effects of inducing an accessory CL in ET programs have not been well systemically analyzed.

Many studies tried to increase P4 concentration to improve the fertility of ET cows, but these studies failed to deliver a clear consensus on the therapeutic benefits of such treatments. Some reported a beneficial effect of GnRH or hCG on conception after ET, while others indicated no obvious improvement. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficacy of hCG and GnRH in the improvement of pregnancy rates of dairy cows in the luteal phase by performing a meta-analysis of the data available from all studies on hCG and GnRH treatment.

2. Materials and Methods

2.1. Identification and Inclusion Criteria of Studies

In this study, PubMed and Web of Science databases were selected to identify eligible studies of recipients with post-ovulation treatment. Keywords used in MeSH search were limited to "Title/Abstract", including (i) embryo transfer or ET, (ii) dairy cattle or cow * or heifer *, (iii) progesterone or GnRH or hCG, and (iv) reproductive or pregnancy or conception. The databases were searched by two of our investigators independently, with each article reviewed as well. For this meta-analysis, only the studies published in English were included.

2.2. Selection Criteria of Studies

Based on Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) guidelines, the principle of PICO (Problem/Patient/Population, Intervention, Comparison, and Outcome) needed to be followed. Inclusion criteria were listed, including (i) population, namely recipient dairy cows in timed ET; (ii) intervention, namely administration of GnRH or hCG; (iii) comparison with control groups not given treatment with any progesterone concentration; and (iv) outcome, namely conception status diagnosis from days 25 to 100 after estrus. Repetitive articles were eliminated, followed by screening, thereby confirming if the resulting quantity of articles were sufficient for meta-analysis (Figure 1).

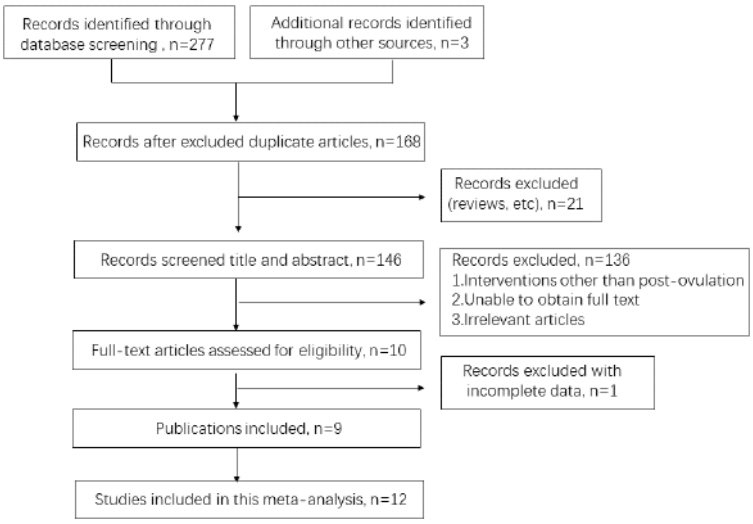


Figure 1. Flow chart for the literature screening.

2.3. Data Extraction and Summary of Experimental Animals

The relevant data parameters were extracted by two independent investigators (F.C. and X.Z.), with disagreements solved by discussion with section partner. Finally, the data parameters below were extracted, namely study ID, first author, publication year, region, features of animal model (species, BCS, and age), information of treated/control (untreated)

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

group (including treatment type (GnRH/hCG), number of animals, dosage, and administration time), and outcome indicators (including pregnancy status and diagnosis time).

2.4. Classification of Studies for Analysis

In view of this meta-analysis, four subgroup analyses were carried out according to the type of treatment, time of treatment, parity of recipients, and the initial pregnancy rate. The impact of treatment on pregnancy loss rate was determined as well.

Regarding the first analysis, classification was applied to the studies based on administration type, namely GnRH (GnRH or GnRH analogue) or hCG.

In the second analysis, classification was applied to the treatment time, namely days 5–7 or days 11–14 of estrus cycle, corresponding to ovulation of dominant follicle (DL) of first or second follicular wave, respectively.

As for the third analysis, subgroups were divided according to parity, namely nulliparous or parous.

As for the fourth analysis, classification was given to the studies based on initial pregnancy rate, namely poor (<40%), and good (≥40%). The initial pregnancy rate was defined as pregnancy rate or conception rate of untreated recipients in each study.

In the fifth analysis, only studies that reported pregnancy diagnoses before day 35 and after day 42 were included; the pregnancy loss rates were compared between treatment and control groups.

2.5. Statistical Analysis

RevMan 5.4.1 was used in the meta-analyses. Heterogeneity degree was evaluated with Cochran Q statistic and I^2 statistic of the proportion of total variation regarding heterogeneity. A value I^2 greater than 50% was considered to display the higher heterogeneity, with random-effect model applied. Otherwise, fixed-effect model needed to be adopted. Identification was given to heterogeneity source, and subgroup analysis was conducted. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Risk ration (RR) and 95% confidence intervals (CIs) of each analysis were exhibited by creating forest plots and in graphic manner. A black box and horizontal line were used in representing each study, and they corresponded to the point estimated 95% CI of each study. Contribution of the study to overall effect was represented by the size of box in forest plot. Pooled RR was estimated, and the diamonds at bottom of the same plot were used in representing 95% CI. Outliers were identified by conducting an influential case diagnosis.

To determine if there was possible interaction and bias between treatment type, time, dosage, and parity of recipients, correlation test was carried out with GraphPad Prism 9.0.0. $p < 0.05$ was considered statistically significant, namely, the two variables were correlated to each other. No significant interaction or correlation was detected among treatment type, time, dosage, and parity of recipients (Supplementary Table S1).

3. Results

3.1. Literature Screening

A total of 277 studies with potential relevance were identified by searching PubMed, Science Direct, and Web of Science. Afterwards, 122 repetitive publications were excluded, 136 publications were excluded by considering inclusion or exclusion criteria, and one publication was eliminated for no controls. As a result, 9 eligible publications and 12 independent studies were included for this study (shown in Figure 1).

3.2. Characteristics of Studies Included

The 12 studies included exhibited difference in parity (multiparity/primiparity), treatment type, and pregnancy rate, etc. General characteristics of the studies included are displayed in Table 1. In view of parity, five studies used parous lactating cows as recipients, six studies adopted heifers, and one study employed both primiparous and multiparous cows. Regarding the treatment, GnRH was adopted in seven studies and hCG in five stud-

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

ies. For the 12 studies, the controls presented a great difference in the chance of pregnancy rate, and the treatments showed different effects on pregnancy rate (Figure 2). The funnel plot did not suggest a bias of publications.

Table 1. Characteristics of the nine included studies.

Studies	Breed of Recipient	Parity	Treatment Type	Dosage	Treatment Time	Treatment (n)	Control (n)	1st Diagnosis (d)	2nd Diagnosis (d)
Block 2003 [37]	dairy cows	Parous/nulliparous	GnRH	100 µg	11	63	85	53	81
Chagas e Silva 2005 [38]	dairy cows	nulliparous	hCG	1500 IU	7	61	63	28	42
Ellington 1991a [39]	dairy cows	nulliparous	GnRH analogue Buserelin	8 µg	7	254	258	35–60	none
Ellington 1991b [39]	dairy cows	nulliparous	GnRH analogue Buserelin	8 µg	11	252	258	35–60	none
Franco 2006 [40]	dairy cows	nulliparous	GnRH	100 µg	11	45	42	45–53	none
Galvão 2006 [41]	dairy cows	Parous	hCG	3300 IU	5	69	66	28	42
García-Guerra 2019 [42]	dairy cows	nulliparous	GnRH	100 µg	5	794	768	33	60
Pinto 2012 [43]	dairy cows	Parous	GnRH analogue	10 µg Buserelin or 750 µg Deslorelin	7	175	92	37	67
Torres 2013a [44]	dairy cows	Parous/nulliparous	hCG	1500 IU	7	30	31	28	42/63
Torres 2013b [44]	dairy cows			1500 IU	7	37	37	28	42/63
Vasconcelo 2011a [45]	dairy cows	Parous	GnRH/hCG	100 µg	7	124	126	28	41
Vasconcelo 2011b [45]	dairy cows			2500 IU	7	122	126	28	41

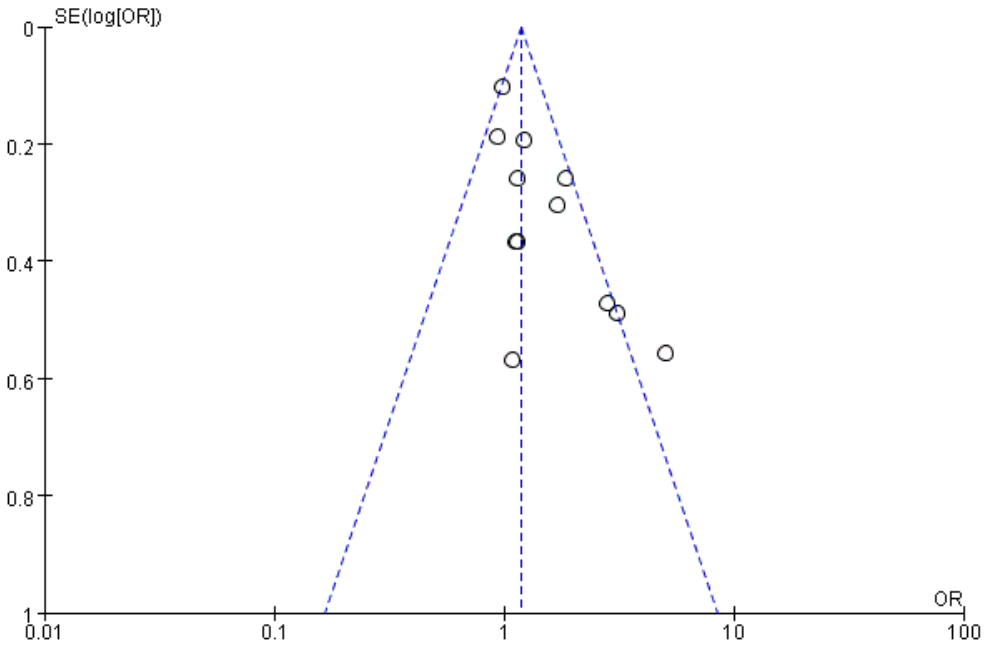


Figure 2. Funnel plot of meta-analysis. Each dot represented a study. The shape of the funnel plots did not reveal any indication of funnel plot asymmetry.

3.3. Effect of Treatment Type

As exhibited by the meta-analysis (Figure 3), the experimental group exhibited a great increase in pregnancy rate with the administration of hCG or GnRH 5 to 11 days after synchronized ovulation (RR = 1.09, $p < 0.05$). Subgroup analyses were further conducted based on the different hormone treatments. As indicated in Figure 1, the pregnancy rate presented no obvious increase when treating cows with 100 µg GnRH or GnRH analogue (8–10 µg Buserelin or 750 µg Deslorelin) (RR = 1.04, $p = 0.26$). However, it showed an obvious increase when treating cows with 1500–3300 IU hCG (RR = 1.39, $p < 0.05$).

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

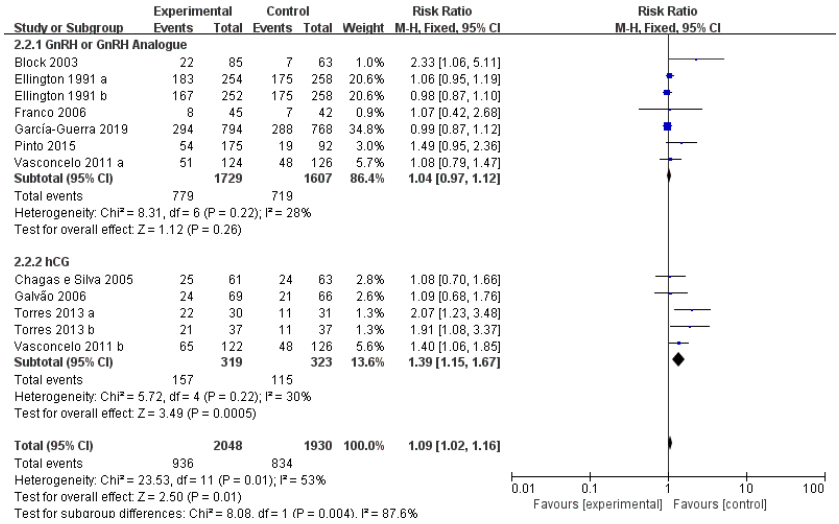


Figure 3. Forest plots: Rist ratio of GnRH and hCG over pregnancy rate of cows after ET. Black boxes refer to the average RR for pregnancy rate improvement with administration regarding every study, with the area proportional to the study contribution to overall analysis. Diamond at bottom denotes pooled RR estimates, and that on right of solid vertical line refers to positive impact of administration on pregnancy rate. Overall RR = 1.09 indicates that administration of GnRH or hCG has favorable impact on fertility.

3.4. Effect of Treatment Time

In view of the 12 available studies, 9 studies treated the animals at ET or two days before ET, inducing ovulation of the dominant follicle (DL) of the first follicular wave. Three studies treated the animals at day 11, inducing DL ovulation of the second follicular wave (Figure 4). Treatment on day 5–7 after synchronized ovulation showed a significant increase (RR = 1.10, $p < 0.05$), while treatment on day 11 reported no obvious change (RR = 1.04, $p = 0.56$).

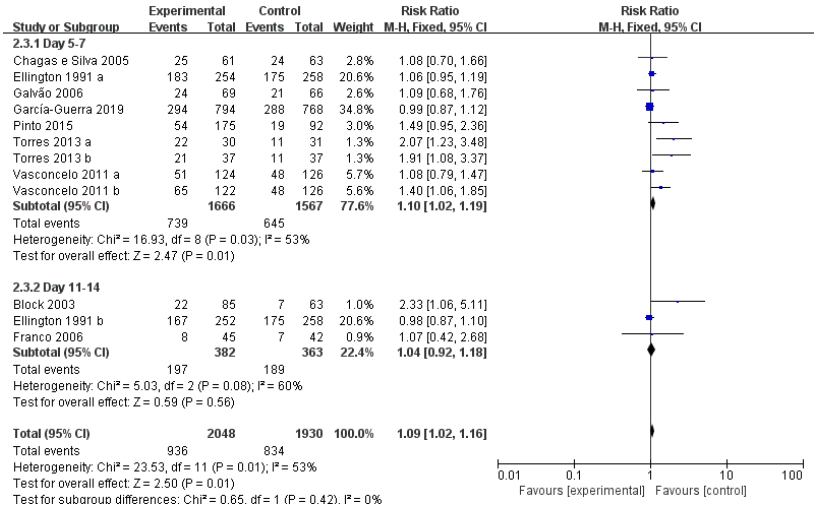


Figure 4. Forest plot: Risk ratio of studies investigating the effect of treatment time on the efficacy of GnRH or hCG treatment on pregnancy rate of cows. Black boxes refer to the average RR for pregnancy rate improvement with administration of every study, with the area proportional to the study contribution to overall analysis. Diamond at bottom denotes pooled RR estimates, and that on right of solid vertical line refers to positive impact of administration on pregnancy rate. As indicated by the results, administration of GnRH or hCG at day 5–7 had a significant benefit on dairy cows.

3.5. Effect of Parity

In view of the 12 studies from nine publications, 5 studies were conducted by adopting heifers, 6 studies were conducted by using multiparous cows, and 1 study did not provide

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

any information on parity status. Moreover, subgroup analysis was performed based on the different status of parity, namely primiparous and multiparous. As shown in Figure 5, there was an obvious difference in experimental group and control group in multiparous cows (RR = 1.32, $p < 0.05$). No significant improvement was reported in heifers ($p = 0.59$).

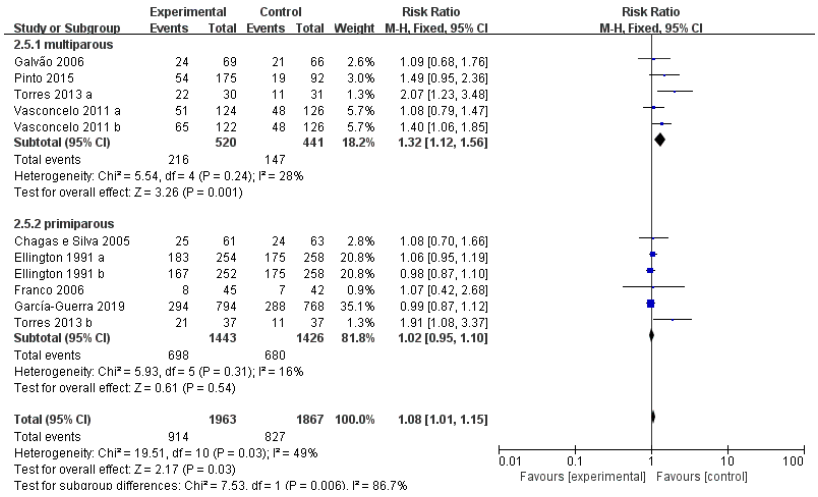


Figure 5. Forest plots: Risk ratio of studies investigating the impact of parity on efficacy of GnRH or hCG on the pregnancy rate of cows after ET. Black boxes refer to the average RR for pregnancy rate improvement with administration of every study, with the area proportional to the study contribution to overall analysis. Diamond at bottom denotes pooled RR estimates, and that on right of solid vertical line refers to positive impact of administration on pregnancy rate. As indicated by the results, administration of GnRH or hCG has significant benefits on multiparous cows.

3.6. Effect of Initial Pregnancy Rate

A total of 10 studies reported poor initial pregnancy rates (Figure 6) (<40%). Meta-analysis indicated a significant improvement in the pregnancy rates of hCG- and GnRH-treated recipients (RR = 1.14, $p < 0.05$). Two included studies reported a good initial pregnancy rate (>40%), and the treatment showed no positive effect on conception rates (RR = 1.02, $p = 0.65$).

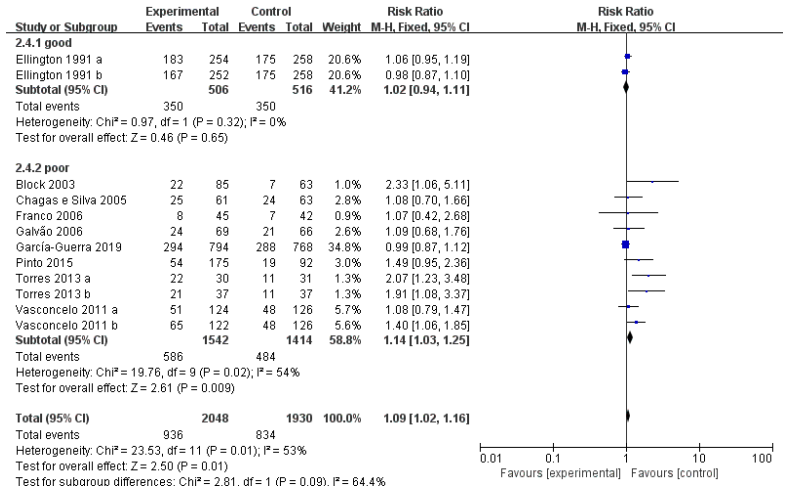


Figure 6. Forest plots: Risk ratio of studies investigating the effect of initial conception rate on efficacy of GnRH or hCG on the pregnancy rate of cows after ET. Black boxes refer to the average RR for pregnancy rate improvement with administration of every study, with the area proportional to the study contribution to overall analysis. Diamond at bottom denotes pooled RR estimates, and that on right of solid vertical line refers to positive impact of administration on pregnancy rate. As indicated by the results, administration of GnRH or hCG have significant benefit on cows with poor pregnancy rates (<40%), but not on cows with good pregnancy rates (>40%).

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

3.7. Pregnancy Loss

As for seven studies included, the pregnancy status of cows was checked more than once, thereby evaluating the impact of P4 supplementation on pregnancy loss. As exhibited by meta-analysis (Figure 7), P4 supplementation had no obvious impact on pregnancy loss rates (RR = 0.86, $p = 0.272$).

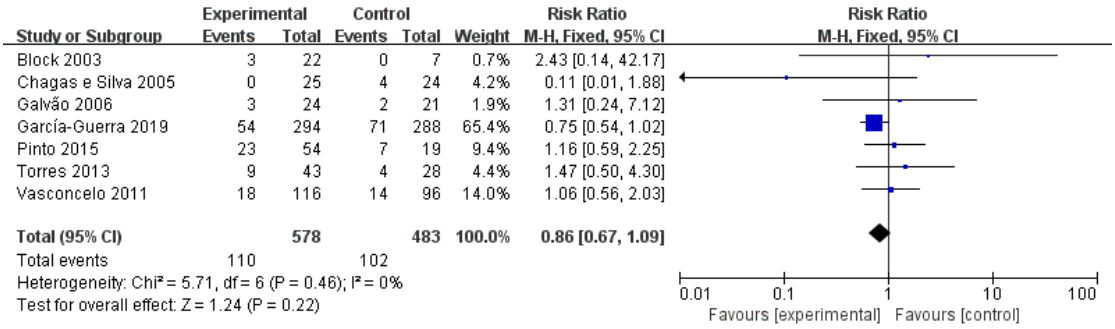


Figure 7. Forest plots: Rist ratio of GnRH and hCG over pregnancy loss rate of cows after ET. Black boxes refer to average RR for pregnancy rate improvement with administration regarding every study, with area proportional to the study contribution to overall analysis. As demonstrated by the results, there is no impact of administration of GnRH or hCG on pregnancy loss ($p > 0.05$).

4. Discussion

Current research suggests that hCG treatment improved the conception rate more compared with GnRH or GnRH analog. Treatment 5–7 days after synchronized ovulation was associated with an increased pregnancy rate compared with later treatment. The treatment significantly enhanced the cows' fertility with very poor fertility (<40%), but had no impact on cows with good fertility (≥40%). Furthermore, the treatment was more effective in parous lactating dairy cows than heifers.

Although some earlier studies found a connection between daily P4 administration and a higher fertility rate in dairy cows [46], there were also opposing results supporting that P4 supplementation after AI or ET was ineffective for fertility in practice [31,32], indicating the treatment type, dosage, and treatment time may impact its efficacy.

Several strategies have been published to increase the circulating P4 during the early luteal phase. These strategies include P4 supplementation during the critical period (days 15–19 after ovulation) [47–49] and accessory CL formation induced by GnRH or hCG administration. According to prior research, accessory CL formation increased P4 concentration and reduced estrogen production [50], positively affecting embryonic survival. As shown in this meta-analysis, the induction of accessory CL with hCG presented a higher pregnancy rate after ET than the control treatment. These data supported the notion that P4 supplementation during embryo implantation positively affected dairy cow fertility.

Additionally, the first-wave follicle ovulation induced by GnRH and hCG could change the follicular dynamics during luteolysis [34] and release more time for the embryo to elongate, thereby rescuing some delayed embryos and increasing the pregnancy rate [35,48]. As indicated by subgroup analysis, hCG administration improved consistency, while GnRH administration had various effects on pregnancy rates. Compared with GnRH, hCG binds to LH receptors of ovarian cells independently of the pituitary glands [51], and its effect is longer lasting than that produced by endogenous LH release [52]. Moreover, the CL formed after ovulation induced by GnRH may not be fully functional [53,54]. Consequently, hCG treatment typically increases progesterone levels more than GnRH treatment [55]. The difference within studies of GnRH treatments was likely caused by the different time points of GnRH treatment and the dosage injected.

Notably, earlier studies indicated a change in the overall pregnancy rate based on the time of administration of AI to cows. As reported by Yan [35], progesterone supplementation at the beginning of the luteal phase, namely before day three after insemination, presented no obvious benefit on the pregnancy rate. This had the underlying mechanism

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

that early treatment with progesterone could promote luteolysis development to a time point for sufficient anti-luteolytic response mustered by the embryo. According to the summary of Besbaci [36], treatment after day 10 of AI had a relation with the higher P/AI by comparing it with GnRH treatment before day 10 of AI. Most animals included in this meta-analysis were administrated with GnRH or hCG on the day of ET or two days before, 5–7 days after estrus. Only in three studies were the cows administrated four days after ET, and no obvious reduction or improvement in pregnancy rate was reported, when compared with ET treatment. It was indicated that inducement of accessory CL during the period of the first follicular wave resulted in a significant increase in pregnancy rate. It is feasible to create a more favorable uterine environment for embryonic development by supplementing progesterone during the early phases of embryonic development, thus rescuing some of the delayed embryos and increasing the cows' fertility. In this study, the ineffectiveness of GnRH treatment on day 11 was consistent with previous results indicating that the ovulatory response to GnRH is poor after day 10 of the cycle due to the lack of a dominant follicle, particularly from day 10 to 14 in two-wave cows, and the inhibitory effect of high progesterone on the induction of an LH surge [56].

Considering that circulating P4 may be limited by the lactating of dairy cows, subgroup analyses was carried out according to parity, namely heifers and parous cows. As demonstrated by the present experiments, GnRH and hCG administration significantly enhanced P/ET in parous cows, showing GnRH and hCG's utility in lactating cattle's luteal support.

This study investigated the impact of the initial pregnancy rate, namely the pregnancy rate of untreated recipient cows, on the progesterone supplementation efficacy on pregnancy rate. According to the findings, treatments with GnRH or hCG could improve P/ET in cattle with low initial fertility (<40%), but have no effect on cows with high fertility (>40%). In fixed-time artificial insemination protocol, P4 supplementation improved P/AI in dairy cows with low fertility (<45%), but it did not cause any benefit for cows with relatively good initial fertility [35], as reported. The pregnancy rate in AI cattle may be impacted by irregular ovulation, incorrect estrus, insufficient CL functions, and inadequate circulating P4 for embryo development. Unlike AI cattle, recipient cattle in ET received relatively good embryos, eliminating the potential negative effect of ovulation or oocyte quality. Hence, CL functions became one of the major challenges to fertility and brought about different responses to accessory CL in dairy cows with different initial fertility. The cows with poor initial fertility and insufficient CL showed obvious responses to P4 treatments. In contrast, cows with good initial fertility possibly had sufficient P4. Thus, the effect of further P4 supplementing treatment on embryo implantation was quite minimal.

Given this meta-analysis, by comparing with controls, GnRH and hCG administration had no obvious effect on pregnancy loss rate. Most of the embryo loss occurred in the first 16 days in dairy cattle, and about 5.8% pregnancy loss occurred in days 32–100 [10] in beef cows. Considering the included trials with pregnancy status diagnosed twice, the overall pregnancy loss rates were 7.3% in controls and 7.4% in treatment groups. These results provided solid evidence that embryo survival in the first month after estrus is essential to improving pregnancy rate and economic benefits.

Notably, the current meta-analysis was undertaken by adopting the studies with GnRH or hCG administrated to cows, exploring whether introducing accessory CL could deliver a consensus improvement in pregnancy rate. Besides administering GnRH or hCG, use of equine chorionic gonadotropin (eCG) in synchronization protocols, estradiol/progestin-based protocols, and GnRH-based protocols were the most common strategies to increase pregnancy rates in fixed-time embryo transfer (FTET) [57]. Numerous studies [58,59] indicated that the administration of eCG in synchronization protocol for FTET resulted in increased pregnancy rates, especially in recipients managed under nonoptimal conditions. However, most of the studies used eCG in the synchronization period instead of the early luteal phase. Only one study used eCG to introduce accessory CL, but on beef cows [60]. As for treatment during the early luteal phase, four available studies adopted a controlled internal drug release (CIDR) after ovulation, thereby enhancing P4 concentration and

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

pregnancy rates. Thereof, three studies [47,61,62] treated beef or dairy cows with CIDR containing 1.9 g P4 for 12–13 days, and they all were not designed with enough statistical power for detecting pregnancy differences between control and CIDR groups (28.6 vs. 41.1%, 15.5 vs. 25.0%, and 67 vs. 73%, respectively). According to the other study [63], the pregnancy rates could be reduced by inserting CIDR 4 days before ET (39.7 vs. 21.3% vs. 15.2%, for ET-Control, ET-CIDR-4, and ET-CIDR-14, respectively). These findings were similar to Yan's meta-analysis conclusion, which concluded that reporting treatment earlier than three days after AI did not correlate with the likelihood of conception per AI.

Nonetheless, the existing studies offer sufficient data for moderator analysis of treatment type and time, parity, and initial fertility. Other factors may impact the pregnancy rate, including the season [64], nutritional status [65], BCS [65], and transferred embryo status (produced in vitro or in vivo, fresh or thawed). For example, the type of embryos (fresh/thawed/semi) and temperature (normal/heat-stressed) may compromise the initial fertility of controls. However, there were insufficient records to examine based on previous research. Climate and management conditions may also impact the fertility of recipients, but we were not able to carry out another subgroups analysis based on insufficient records about climate or season. A further study based on five heat-stressed dairy recipient cow studies indicated that GnRH/hCG improves conception rate in quite high temperatures (Supplementary Figure S1). The best reproductive management strategies rely on various factors. By undertaking further research, it will be possible to compare the effects of the above moderators on overall reproductive performance, hence directing field application.

5. Conclusions

This meta-analysis examined the association between the formation of accessory CLs around ET and ET outcome in dairy cows. The induction of accessory CL with hCG could improve the conception rates of recipient dairy cows, while GnRH and GnRH analogue did not result in significant changes. The results clearly demonstrated that the administration of hCG or GnRH 5–7 days after synchronized ovulation was associated with increased pregnancy rate, compared with later treatment. The induction of accessory CL with GnRH or hCG greatly enhanced the reproductive performance of recipient cows with low fertility. There was no difference observed in the occurrence of pregnancy loss between GnRH- and hCG-treated cows and controls. This meta-analysis demonstrated the benefit of inducing accessory CLs with hCG or GnRH in ET recipient cows, and highlighted the importance of treatment type, time, parity, and initial fertility in achieving higher pregnancy rates.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/vetsci10050309/s1, Figure S1: Treatment with hCG or GnRH on pregnancy rates of heat-stressed dairy cows.; Table S1: Interaction test.

Author Contributions: F.C., Y.H. and C.M. conceived and designed this study. F.C. and X.Z. gave a systematic review of the literature, extracted data, and drafted the manuscript. R.G. and Z.S. supervised this study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work was funded by the National Natural Science Foundation (NSFC) of China (1802066), the Natural Science Foundation of Jiangsu (BK20190256), the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No. cstc2020jcyj-msxmX0369), and the Inner Mongolia Municipality Science and Technology Program (2021GG0402).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The corresponding author may provide the data used in this research upon request.

Acknowledgments: We acknowledge and appreciate the information that was provided by the referenced authors for this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

References

1. Lucy, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.* **2001**, *84*, 1277–1293. [CrossRef] [PubMed]
2. Butler, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, *60–61*, 449–457. [CrossRef] [PubMed]
3. Ahmed, A.; Tiwari, R.P.; Mishra, G.K.; Jena, B.; Dar, M.A.; Bhat, A.A. Effect of environmental heat stress on reproduction performance of dairy cows—A review. *Int. J. Livest. Res.* **2015**, *5*, 10–18. [CrossRef]
4. Roth, Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: Mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* **2008**, *43*, 238–244. [CrossRef] [PubMed]
5. Payton, R.R.; Rispoli, L.A.; Saxton, A.M.; Edwards, J.L. Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. *J. Reprod. Dev.* **2011**, *57*, 471–481. [CrossRef]
6. Baruselli, P.S.; Ferreira, R.M.; Vieira, L.M.; Souza, A.H.; Bo, G.A.; Rodrigues, C.A. Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology* **2020**, *155*, 1–11. [CrossRef]
7. Ferreira, R.M.; Ayres, H.; Chiaratti, M.R.; Ferraz, M.L.; Araujo, A.B.; Rodrigues, C.A.; Watanabe, Y.F.; Vireque, A.A.; Joaquim, D.C.; Smith, L.C.; et al. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 2383–2392. [CrossRef]
8. Ferreira, R.M.; Chiaratti, M.R.; Macabelli, C.H.; Rodrigues, C.A.; Ferraz, M.L.; Watanabe, Y.F.; Smith, L.C.; Meirelles, F.V.; Baruselli, P.S. The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. *Biol. Reprod.* **2016**, *94*, 133017. [CrossRef]
9. Roth, Z. Symposium review: Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 3642–3654. [CrossRef]
10. Bortoletto, P.; Bakkensen, J.; Anchan, R.M. Embryo transfer: Timing and techniques. *Minerva Endocrinol.* **2018**, *43*, 57–68. [CrossRef]
11. Dochi, O.; Takahashi, K.; Hirai, T.; Hayakawa, H.; Tanisawa, M.; Yamamoto, Y.; Koyama, H. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology* **2008**, *69*, 124–128. [CrossRef] [PubMed]
12. Baruselli, P.S.; Ferreira, R.M.; Sales, J.N.; Gimenes, L.U.; Sa Filho, M.F.; Martins, C.M.; Rodrigues, C.A.; Bo, G.A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* **2011**, *76*, 1583–1593. [CrossRef] [PubMed]
13. Nowicki, A. Embryo transfer as an option to improve fertility in repeat breeder dairy cows. *J. Vet. Res.* **2021**, *65*, 231–237. [CrossRef]
14. Hasler, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **2003**, *79*, 245–264. [CrossRef]
15. Diskin, M.G.; Murphy, J.J.; Sreenan, J.M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **2006**, *96*, 297–311. [CrossRef]
16. Lonergan, P.; Sánchez, J.M.; Mathew, D.J.; Passaro, C.; Fair, T. Embryo development in cattle and interactions with the reproductive tract. *Reprod. Fertil. Dev.* **2018**, *31*, 118–125. [CrossRef] [PubMed]
17. Dunne, L.D.; Diskin, M.G.; Sreenan, J.M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, *58*, 39–44. [CrossRef] [PubMed]
18. Ryan, D.P.; Prichard, J.F.; Kopel, E.; Godke, R.A. Comparing early embryo mortality in dairy-cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* **1993**, *39*, 719–737. [CrossRef]
19. Reese, S.T.; Franco, G.A.; Poole, R.K.; Hood, R.; Fernadez Montero, L.; Oliveira Filho, R.V.; Cooke, R.F.; Pohler, K.G. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. *Anim. Reprod. Sci.* **2020**, *212*, 106251. [CrossRef]
20. Wiltbank, M.C.; Baez, G.M.; Garcia-Guerra, A.; Toledo, M.Z.; Monteiro, P.L.; Melo, L.F.; Ochoa, J.C.; Santos, J.E.; Sartori, R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* **2016**, *86*, 239–253. [CrossRef]
21. Sartori, R.; Bastos, M.R.; Wiltbank, M.C. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **2010**, *22*, 151–158. [CrossRef] [PubMed]
22. Mathew, D.J.; Peterson, K.D.; Senn, L.K.; Oliver, M.A.; Ealy, A.D. Ruminant conceptus-maternal interactions: Interferon-tau and beyond. *J. Anim. Sci.* **2022**, *100*, skac123. [CrossRef]
23. Lonergan, P.; Forde, N.; Spencer, T. Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **2016**, *28*, 66–74. [CrossRef]
24. Nanas, I.; Chouzouris, T.M.; Dovolou, E.; Dadouli, K.; Stamperna, K.; Kateri, I.; Barbagianni, M.; Amiridis, G.S. Early embryo losses, progesterone and pregnancy associated glycoproteins levels during summer heat stress in dairy cows. *J. Therm. Biol.* **2021**, *98*, 102951. [CrossRef]
25. Geisert, R.D.; Morgan, G.L.; Short, E.C., Jr.; Zavy, M.T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **1992**, *4*, 301–305. [CrossRef]
26. Graham, J.D.; Clarke, C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 502–519. [CrossRef]
27. Lonergan, P. Influence Of Progesterone On oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* **2011**, *76*, 1594–1601. [CrossRef] [PubMed]
28. Mann, G.E.; Lamming, G.E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *J. Reprod. Fertil.* **1995**, *104*, 245. [CrossRef] [PubMed]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

29. Hansen, T.R.; Sinedino, L.D.P.; Spencer, T.E. Paracrine and endocrine actions of interferon Tau (Ifnt). *Reproduction* **2017**, *154*, F45–F59. [CrossRef] [PubMed]
30. Wiltbank, M.; Lopez, H.; Sartori, R.; Sangsritavong, S.; Gumen, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* **2006**, *65*, 17–29. [CrossRef]
31. Mendonca, L.G.D.; Mantelo, F.M.; Stevenson, J.S. Fertility of lactating dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone at ai, 5 days after ai, or both, during summer heat stress. *Theriogenology* **2017**, *91*, 9–16. [CrossRef] [PubMed]
32. Nascimento, A.B.; Bender, R.W.; Souza, A.H.; Ayres, H.; Araujo, R.R.; Guenther, J.N.; Sartori, R.; Wiltbank, M.C. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 2873–2882. [CrossRef] [PubMed]
33. Cunha, T.O.; Martinez, W.; Walleser, E.; Martins, J.P.N. Effects of gnrh and hcg administration during early luteal phase on estrous cycle length, expression of estrus and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology* **2021**, *173*, 23–31. [CrossRef]
34. Cunha, T.O.; Statz, L.R.; Domingues, R.R.; Andrade, J.P.N.; Wiltbank, M.C.; Martins, J.P.N. Accessory corpus luteum induced by human chorionic gonadotropin on day 7 or days 7 and 13 of the estrous cycle affected follicular and luteal dynamics and luteolysis in lactating holstein cows. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 2631–2650. [CrossRef] [PubMed]
35. Yan, L.; Robinson, R.S.; Shi, Z.; Mann, G.E. Efficacy of progesterone supplementation during early pregnancy in cows: A meta-analysis. *Theriogenology* **2016**, *85*, 1390–1398.e1. [CrossRef]
36. Besbaci, M.; Abdelli, A.; Minviel, J.J.; Belabdi, I.; Kaidi, R.; Raboisson, D. Association of pregnancy per artificial insemination with gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin administered during the luteal phase after artificial insemination in dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 2006–2018. [CrossRef]
37. Block, J.; Drost, M.; Monson, R.L.; Rutledge, J.J.; Rivera, R.M.; Paula-Lopes, F.F.; Ocon, O.M.; Krininger, C.E.; Liu, J.; Hansen, P.J. Use of insulin-like growth factor-i during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J. Anim. Sci.* **2003**, *81*, 1590–1602. [CrossRef]
38. Chagas E Silva, J.; Lopes Da Costa, L. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theriogenology* **2005**, *64*, 49–60. [CrossRef]
39. Ellington, J.E.; Foote, R.H.; Farrell, P.B.; Hasler, J.F.; Webb, J.; Henderson, W.B.; Mcgrath, A.B. Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology* **1991**, *36*, 1035–1042. [CrossRef]
40. Franco, M.; Block, J.; Jousan, F.D.; e Paula, L.A.d.C.; Brad, A.M.; Franco, J.M.; Grisel, F.; Monson, R.L.; Rutledge, J.J.; Hansen, P.J. Effect of transfer of one or two in vitro-produced embryos and post-transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle. *Theriogenology* **2006**, *66*, 224–233. [CrossRef]
41. Galvão, K.N.; Santos, J.E.; Coscioni, A.C.; Juchem, S.O.; Chebel, R.C.; Sischo, W.M.; Villaseñor, M. Embryo survival from gossypol-fed heifers after transfer to lactating cows treated with human chorionic gonadotropin. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 2056–2064. [CrossRef] [PubMed]
42. García-Guerra, A.; Sala, R.V.; Carrenho-Sala, L.; Baez, G.M.; Motta, J.C.L.; Fosado, M.; Moreno, J.F.; Wiltbank, M.C. Postovulatory treatment with gnrh on day 5 reduces pregnancy loss in recipients receiving an in vitro produced expanded blastocyst. *Theriogenology* **2020**, *141*, 202–210. [CrossRef] [PubMed]
43. Pinto, T.L.C.; Nogueira, M.B.R.; Sales, J.N.D.S.; Carvalho, R.R.D.; Cushman, R.A.; Souza, J.C.D. Factors affecting pregnancy rates after ovum pick up-derived embryo transfer in lactating holstein recipients under tropical conditions. *Ciência Agrotecnologia* **2015**, *39*, 498–505. [CrossRef]
44. Torres, A.; Chagas E Silva, J.; Deloche, M.C.; Humblot, P.; Horta, A.E.; Lopes-Da-Costa, L. Secondary corpora lutea induced by hcg treatment enhanced demi-embryo survival in lactating high-yielding dairy cows. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* **2013**, *48*, 643–650. [CrossRef]
45. Vasconcelos, J.L.; Og, S.F.; Justolin, P.L.; Morelli, P.; Aragon, F.L.; Veras, M.B.; Soriano, S. Effects of postbreeding gonadotropin treatments on conception rates of lactating dairy cows subjected to timed artificial insemination or embryo transfer in a tropical environment. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 223–234. [CrossRef]
46. Mann, G.E.; Lamming, G.E.; Robinson, R.S.; Wathes, D.C. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1999**, *54*, 317.
47. Marques, M.O.; Nasser, L.F.; Silva, R.; Bó, G.; Sales, J.; Filho, M.F.S.; Reis, E.L.; Binelli, M.; Baruselli, P.S. Follicular dynamics and pregnancy rates in bos taurus x bos indicus embryo transfer recipients treated to increase plasma progesterone concentrations. *Anim. Reprod.* **2012**, *9*, 118–119.
48. Binelli, M.; Thatcher, W.W.; Mattos, R.; Baruselli, P.S. antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* **2001**, *56*, 1451–1463. [CrossRef]
49. Thatcher, W.W.; Moreira, F.; Pancarci, S.M.; Bartolome, J.A.; Santos, J.E.P. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2002**, *23*, 243–254. [CrossRef]
50. Araujo, R.R.; Ginther, O.J.; Ferreira, J.C.; Palhao, M.M.; Beg, M.A.; Wiltbank, M.C. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biol. Reprod.* **2009**, *81*, 426–437. [CrossRef]
51. De Rensis, F.; Lopez-Gatius, F.; Garcia-Ispierto, I.; Techakumpu, M. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows: An update. *Theriogenology* **2010**, *73*, 1001–1008. [CrossRef]

52. Schmitt, E.J.; Barros, C.M.; Fields, P.A.; Fields, M.J.; Diaz, T.; Kluge, J.M.; Thatcher, W.W. A Cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* **1996**, *74*, 1915–1929. [CrossRef]
53. Santos, J.E.; Thatcher, W.W.; Pool, L.; Overton, M.W. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 2881–2894. [CrossRef]
54. Schmitt, E.J.; Diaz, T.; Drost, M.; Thatcher, W.W. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J. Anim. Sci.* **1996**, *74*, 1084–1091. [CrossRef]
55. Cabrera, E.M.; Lauber, M.R.; Peralta, E.M.; Bilby, T.R.; Fricke, P.M. Human chorionic gonadotropin dose response for induction of ovulation 7 days after a synchronized ovulation in lactating holstein cows. *Jds Commun.* **2021**, *2*, 35–40. [CrossRef] [PubMed]
56. Giordano, J.O.; Fricke, P.M.; Guenther, J.N.; Lopes, G., Jr.; Herlihy, M.M.; Nascimento, A.B.; Wiltbank, M.C. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 3781–3793. [CrossRef] [PubMed]
57. Bó, G.A.; Peres, L.C.; Cutaia, L.E.; Pincinato, D.; Baruselli, P.S.; Mapletoft, R.J. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reprod. Fertil. Dev.* **2011**, *24*, 272–277. [CrossRef]
58. Baruselli, P.S.; Ferreira, R.M.; Mf, S.F.; Nasser, L.F.; Rodrigues, C.A.; Bó, G.A. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod. Fertil. Dev.* **2010**, *22*, 67–74. [CrossRef]
59. Bó, G.A.; Baruselli, P.S.; Moreno, D.; Cutaia, L.; Caccia, M.; Tríbulo, R.; Tríbulo, H.; Mapletoft, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* **2002**, *57*, 53–72. [CrossRef]
60. O'hara, L.; Forde, N.; Duffy, P.; Randi, F.; Kelly, A.K.; Valenza, A.; Rodriguez, P.; Lonergan, P. Effect of combined exogenous progesterone with luteotrophic support via equine chorionic gonadotrophin (ecg) on corpus luteum development, circulating progesterone concentrations and embryo development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **2016**, *28*, 269–277. [CrossRef] [PubMed]
61. Steichen, M.M.; Larson, J.E. Effects of supplemental progesterone using a cidr insert on pregnancy per embryo transfer of dairy heifer recipients of embryos produced in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* **2019**, *203*, 45–51. [CrossRef]
62. Chagas E Silva, J.; Diniz, P.; Lopes Da Costa, L. Luteotrophic effect, growth and survival of whole versus half embryos and, their relationship with plasma progesterone concentrations of recipient dairy heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, *104*, 18–27. [CrossRef]
63. Monteiro, P.L., Jr.; Nascimento, A.B.; Pontes, G.C.; Fernandes, G.O.; Melo, L.F.; Wiltbank, M.C.; Sartori, R. Progesterone supplementation after ovulation: Effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to Ai Or Et. *Theriogenology* **2015**, *84*, 1215–1224. [CrossRef] [PubMed]
64. Mastromonaco, G.F.; Gonzalez-Grajales, A.L. Reproduction in female wild cattle: Influence of seasonality on arts. *Theriogenology* **2020**, *150*, 396–404. [CrossRef] [PubMed]
65. Fontes, P.L.P.; Oosthuizen, N.; Ciriaco, F.M.; Sanford, C.D.; Canal, L.B.; Cooke, R.F.; Pohler, K.G.; Henry, D.D.; Mercadante, V.R.G.; Ealy, A.D.; et al. Effects of nutrient restriction on the metabolic profile of bos indicus-influenced and b. taurus suckled beef cows. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* **2021**, *15*, 100166. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

scientific reports

Check for updates

OPEN

The impact of difficult embryo transfer on the success of IVF: a systematic review and meta-analysis

Giulia Galati[1]✉, Marco Reschini[2], Laura Mensi[2], Camilla Di Dio[1], Edgardo Somigliana[2,3] & Ludovico Muzii[1]

The procedure of embryo transfer (ET) must be as gentle as possible since any traumatism may cause uterine contractility that interferes with the implantation. However, this ideal conduct is not always possible, and additional measures may be necessary (difficult ET). Different studies have evaluated the impact of difficult ET on the clinical pregnancy rate (CPR), but results were not univocal. The present systematic review and meta-analysis was aimed to provide a precise estimate of the possible detrimental effects of difficult ET on CPR. The study protocol was registered online (PROSPERO number: CRD42023387197). An electronic database search was performed to identify articles published until September 2022. The primary outcome was CPR. Fifteen studies fulfilled the inclusion criteria. Difficult ET significantly reduced the CPR (OR 0.70; 95%CI: 0.64–0.76; p < 0.0001. All pre-planned subgroup analyses according to study design (retrospective vs prospective studies), historical period (studies published before and after 2010), type of catheter, frequency of difficult cases (> or < 19%) and pregnancy rate (> or < 38%) confirmed the significant association. Difficult ET is associated with a significant reduction of CPR. Further studies are warranted to understand how to prevent or manage this common clinical situation.

Successful embryo implantation in IVF requires a viable embryo, a receptive endometrium, and a finest technique. The procedure of embryo transfer (ET) is unanimously claimed to be crucial for the success of IVF[1]. The procedure should be guided by ultrasound, soft catheters should be preferred, and the embryos should be released at about 1–2 cm from the fundus of the uterus[1–3]. There is also evidence suggesting that concomitant administration of hyaluronic acid (HA), Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), human Chorionic Gonadotropin (hCG), or atosiban may improve the success rate, but the effectiveness of these add-ons remains debated[1,4].

Fanchin and Ayoubi affirmed that the procedure of ET must be as gentle as possible since any traumatism may cause the release of oxytocin, boosting the uterine contractility that interferes with the implantation[5]. However, this ideal conduct is not always possible. The insertion of the catheter in the uterine cavity may be difficult because of a stenosis and a tortuosity of the cervical canal or a severe anteversion/retroversion of the uterus. Hard catheters may be needed in these cases. In most challenging situations, the application of tenaculum forceps may be required to allow counter traction and facilitating the insertion of the catheter. All the situations deviating from an unremarkable transfer are grossly unified under the term "difficult ET".

Different studies have evaluated the impact of difficult ET on the clinical pregnancy rate, but results were inconsistent. However, a meta-analysis performed in 2013 and including only five studies highlighted a RR of clinical pregnancy of 0.75 (95%CI: 0.66–0.86)[6]. We deem of relevance further investigating this issue by adjourning this meta-analysis because a definitive demonstration of a detrimental effect can have immediate clinical implications. One may consider studying more in-depth pharmacological interventions that can temper the uterine contractility or postponing the transfer and freezing of all embryos. This latter approach would allow to tune the best strategy for the insertion of the catheter in a calm context without the need for transferring (proof of transfer or mock ET). To note, some centers systematically perform a preliminary mock ET to identify women at risk of difficult ET and better plan the technique.

[1]Department of Maternal and Child Health and Urology, Sapienza University, 00161 Rome, Italy. [2]Infertility Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy. [3]Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan, Milan, Italy. ✉email: giulia.galati@uniroma1.it

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Materials and methods

Search strategy

The present systematic review and meta-analysis was performed in accordance with guidelines from Cochrane Collaboration and followed Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses guidelines. The study protocol was registered online in the International Prospective Register Systematic Reviews (PROSPERO number: CRD42023387197). An Ethical Committee acceptance was not requested since only published and anonymized data were used.

An electronic database search was performed to identify articles published until September 2022. Pubmed and Medline were screened to identify studies that evaluated difficult ET and its effects on pregnancy rate using a combination of the following terms: "difficult embryo transfer" OR "easy embryo transfer". Inclusion criteria of studies were: (1) English language, (2) evaluation of the outcome, (3) patients undergoing fresh or frozen–thawed ET, (4) presence of a control group. After confirmation of pertinence, studies were excluded if reporting partial or incomplete data.

A broadly inclusive search was conducted initially followed by a subsequent restriction for studies focused on pregnancy rate after difficult ET during the title/abstract review process. Data presented exclusively at meetings were not considered.

The reference lists of reviews and relevant articles were screened by hand to identify additional eligible publications. Articles considered were randomized clinical trials (RCTs), prospective or retrospective observational studies. Case reports or small series were excluded. The protocol was designed a priori defining methods for collecting, extracting, and analyzing data. The electronic search was conducted independently by two investigators (G.G. and M.R.). All articles considered relevant based on the title and abstract were retrieved. Subsequently, three investigators (C.D.D., G.G., and L.M.) independently read the full text of the pre-selected articles to verify the pertinence of those for the aim of this analysis. Studies were excluded if reporting partial or duplicate data sets. In case of disagreement on the inclusion or exclusion of preselected studies for meta-analysis, or any other disagreement through the review process, the consensus was reached after discussion involving all researchers.

Quality assessment

The studies were then classified qualitatively according to the guidelines published in the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Two authors (G.G. and L.M.) independently assessed the selected studies for risks of bias using the Newcastle–Ottawa Quality Assessment Scale.

The authors also graded the quality of evidence using the Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) approach[7]. Quality of evidence was downgraded by one level for serious concerns and by two levels for very serious concerns for risk of bias, inconsistency, indirectness, imprecision, and publication bias.

Outcomes

The primary outcome was Clinical pregnancy rate (CPR), defined as the presence of an intrauterine gestational sac. The secondary outcome was live birth rate. The following subgroup analyses were pre-planned: mode of recruitment (retrospective or prospective), study period (divided according to the date of publication, before and after 2010), type of catheter (Cook or Wallace catheters), frequency of difficult cases (using the median to divide into two groups) and CPR in the control group (using the median to divide into two groups). If an unpaired number of studies was selected, the study corresponding to the median was included in the group above that median.

The impact of difficult embryo transfer on clinical pregnancy was expressed using the odd ratio (OR) with 95% CI.

The inconsistency of the studies' results was measured using Cochrane Q and the I^2 statistic[8]. Risk estimates were combined in a meta-analysis using a fixed effects model when the heterogeneity found among the studies was absent to moderate ($0\% \le I^2 < 30\%$). When heterogeneity was moderate, substantial, or considerable ($I^2 \ge 30\%$), the DerSimonian and Laird method was used[9,10] for a random-effects model. All analyses were performed using Review Manager (RevMan) [Computer program], Version 5.4, The Cochrane Collaboration, 2020.

Results

Study selection

Our electronic databases search initially yielded 526 articles. Title and abstract screening selected a total of 43 studies eligible for full-text evaluation. Twenty-seven of them were excluded as detailed in the PRISMA flowchart in Fig. 1. Sixteen studies fulfilled the inclusion criteria: their main characteristics are shown in Table 1.

Study characteristics

All 16 studies were included in the meta-analysis encompassing a total of 29,947 patients[11–26]. The ET was quoted as difficult in 3544 cases (11.83%). Five were prospective controlled studies and eleven were retrospective studies. All studies reported the clinical pregnancy rate. Five studies also reported miscarriage rate and only seven reported the live birth rate. The definition of difficult embryo transfer was very similar. All but one defined the difficulty as the need for additional measures (use of hard catheter, malleable stylet, or tenaculum). Only one study referred to the subjective assessment of the operators[13]. Three studies performed ET using Cook catheter and seven using Wallace catheter. In four studies the enrolment period ranged from 1998 to 2005, in twelve studies it ranged from 2016 to 2017.

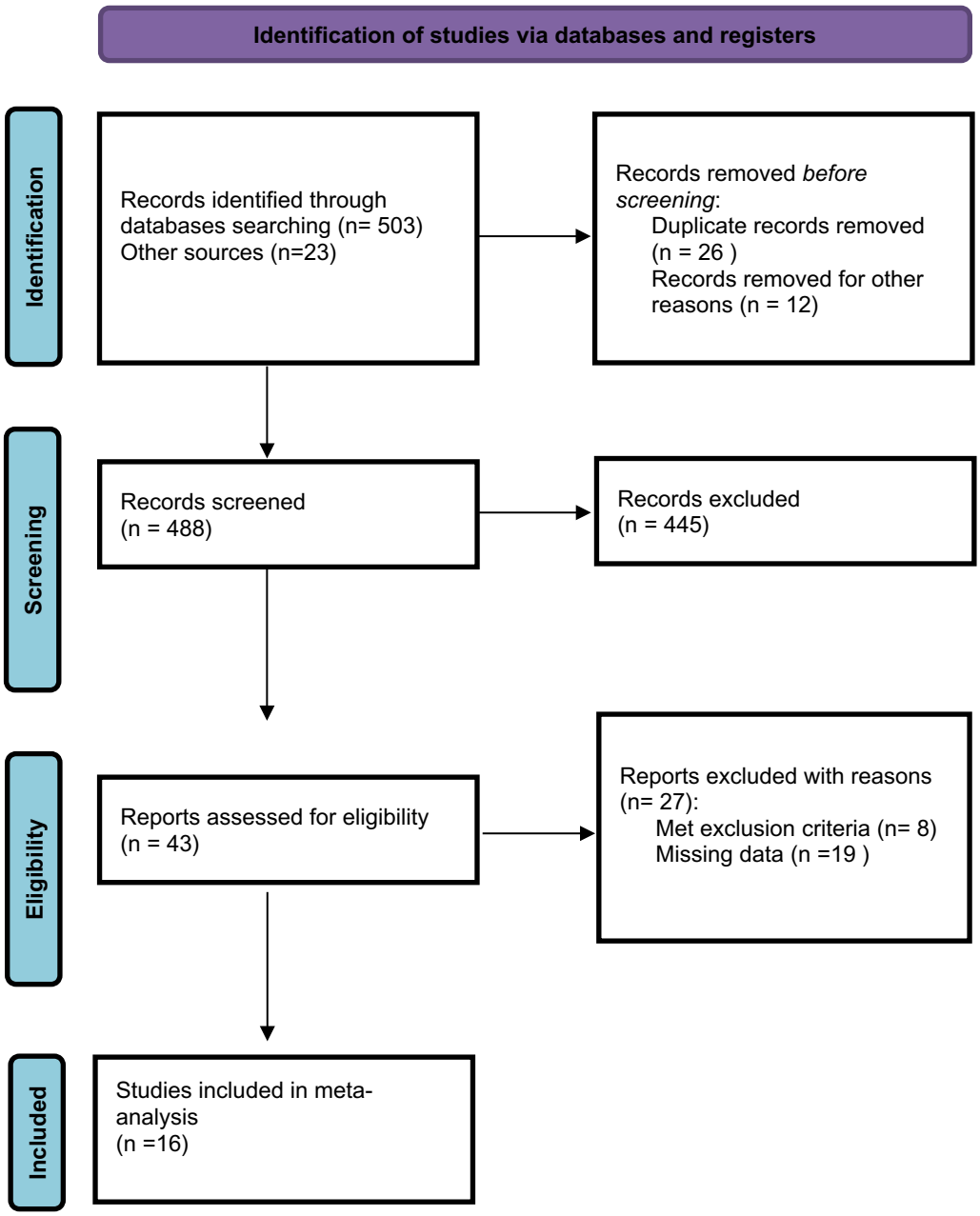


Figure 1. PRISMA flowchart for study identification and inclusion/exclusion.

Risk of bias and quality assessment results

Results obtained from our risk of bias assessment for all the 16 studies are summarized in Supplemental Table 1. Overall, the quality assessment showed low risk of bias. Among the nine applicable stars assessing three main categories of selection, comparability and outcomes, the eligible studies received eight.

The quality of evidence according to the GRADE system was low in all studies.

Results of syntheses

All 16 studies including women who performed ET were meta-analyzed[11–26]. Difficult ET group significantly reduced the pregnancy rate. The pooled OR was 0.71 (95%CI: 0.66–0.77; $p < 0.0001$) (Fig. 2). Heterogeneity for this comparison was I^2 26%. When focusing on live birth rate (n = 7 studies), the pooled OR was 0.68 (95%CI: 0.59–0.77; $p = 0.00001$) and the heterogeneity was I^2 9% (Fig. 3).

Pre-planned subgroup analyses are shown in Fig. 4. All were statistically significant ($p < 0.0001$) and heterogeneity varied between 0 and 42%. The pooled OR for prospective[14–17, 21] and retrospective studies[11–13, 18–20, 22–26] were 0.76 (95%CI: 0.66–0.88) and 0.69 (95%CI: 0.62–0.75), respectively (Fig. 4A). The pooled OR for studies published before (n = 4) and after (n = 12) 2010 were 0.74 (95%CI: 0.63–0.87) and 0.70 (95%CI: 0.64–0.77), respectively (Fig. 4B). The pooled OR for studies in which the ET was performed using Cook (n = 3) or Wallace

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Author	Year	Study design	Country	Recruitment period	Sample size	Outcomes
Alvarez M	2019	Retrospective observational study	Spain	2014–2016	370	CPR, LBR
Alvero R	2003	Retrospective observational study	USA	1998–1999	583	CPR
Coats E	2019	Prospective cohort study	UK	2014–2016	174	CPR, LBR
Ghaffari F	2013	Prospective cohort study	Iran	2009–2010	706	CPR
Kava-Braverman A	2016	Retrospective observational study	Spain	2009–2015	7611	CPR, LBR
Larue L	2016	Prospective observational study	France	2010–2012	306	CPR
Larue L	2020	Prospective observational study	France	2014–2020	2046	CPR
Listijono DR	2013	Retrospective observational study	Australia	2005–2010	6484	CPR, LBR
Noyes N	1999	Retrospective observational study	USA	1995–1998	1117	CPR
Plowden TC	2017	Retrospective observational study	USA	2012–2013	922	CPR, LBR
Öztürk İnal Z	2021	Prospective cohort study	Turkey	2012–2017	2257	CPR
Singh N	2012	Retrospective observational study	India	2008–2010	342	CPR
Spitzer D	2012	Retrospective observational study	Austria	2005–2009	1055	CPR, LBR
Tomás C	2002	Retrospective observational study	Finland	1994–2000	4807	CPR
Tur-Kaspa I	1998	Retrospective observational study	Israel	1994–1996	854	CPR, LBR
Yilmaz N	2013	Retrospective observational study	Turkey	2010–2012	313	CPR

Table 1. Characteristics of the included studies. CPR, clinical pregnanct rate; LBR, live birth rate.

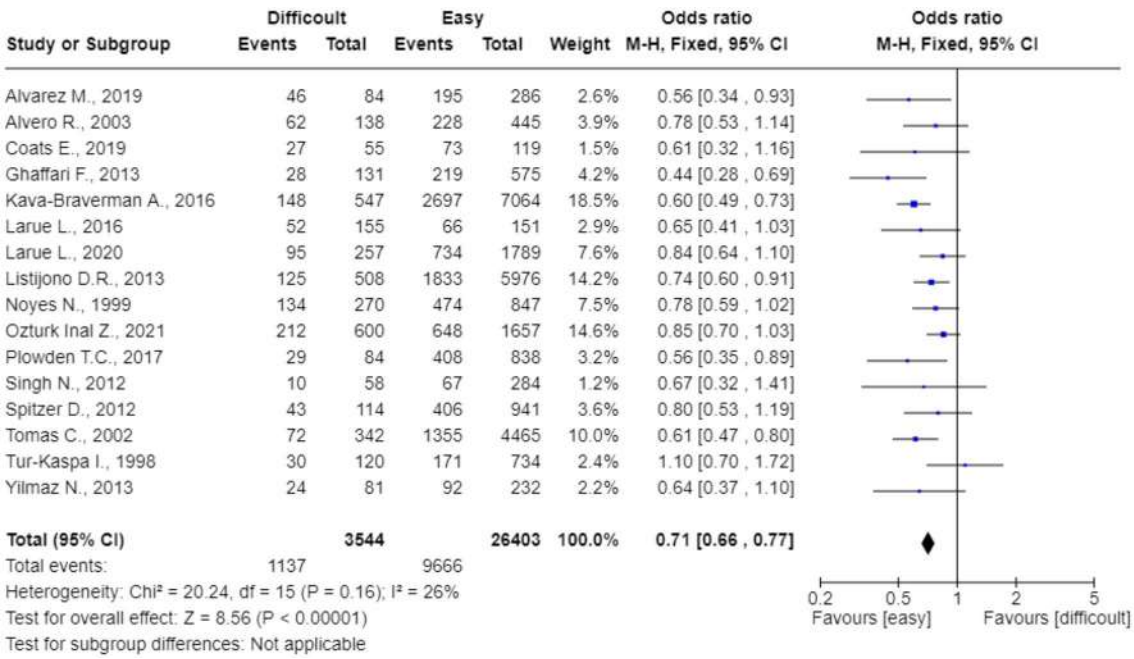


Figure 2. The effect of Difficult Embryo Transfer on the clinical pregnancy rate.

(n = 7) catheters were 0.69 (95%CI: 0.58–0.80) and 0.68 (95%CI: 0.60–0.77), respectively (Fig. 4C). The pooled OR for studies with a frequency of difficult cases greater (n = 8) and less (n = 8) than 18% (cut-off chosen based on the median) were 0.73 (95%CI: 0.65–0.83) and 0.70 (95%CI: 0.63–0.77), respectively (Fig. 4D). The pooled OR for studies with clinical pregnancy rate in the control group greater (n = 9) and less (n = 7) than 38% (cut-off chosen based on the median) were 0.77 (95%CI: 0.69–0.86) and 0.65 (95%CI: 0.58–0.73), respectively (Fig. 4E).

Discussion

The present meta-analysis confirmed previous findings suggesting that difficult ET was associated with a significant reduction in the chance of clinical pregnancy[6]. The estimated impact is a relative reduction of 30%, a rate that is clinically remarkable and relevant. To note, the low amplitude of the 95%CI (0.64–0.76) allows us to infer that the relative reduction is at least 24%. In other words, difficult ET is associated to the wastage of a viable embryo able to implant in at least one in four women.

The previous meta-analysis published in 2013 included only five studies (the estimate was inevitably less precise), the authors could not thus perform subgroup analyses and results inevitably referred to older series[6]. Our results extend the findings by reporting a more precise estimate of the detrimental effect (we included 16

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

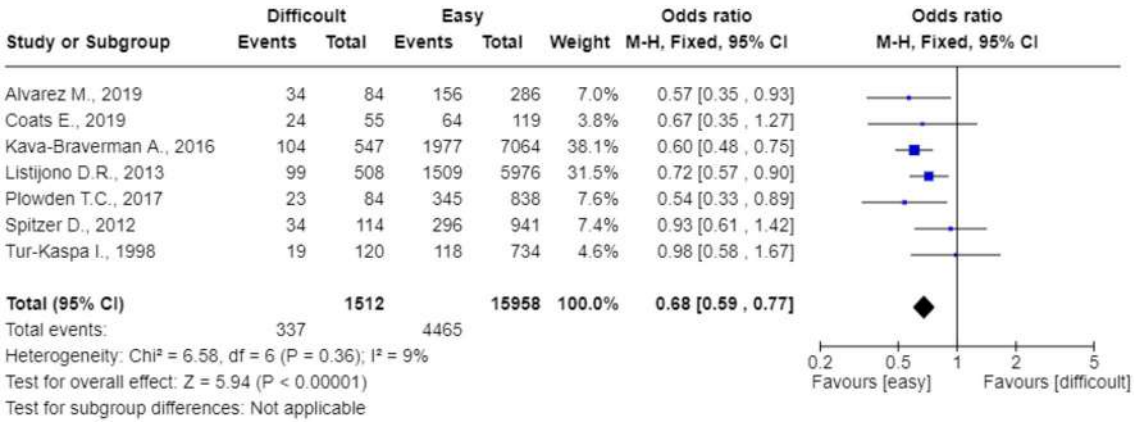


Figure 3. The effect of Difficult Embryo Transfer on the live birth rate.

studies) and by highlighting that the progresses in IVF instrumentations have not overcome the issue. Results were similar regardless of the type of catheter used and, most importantly, the historical subgroup analyses (i.e., when we evaluated separately studies published before and after 2010) did not highlight any change over time. There is even a slight trend to a more relevant impact in more recent studies (OR = 0.68, 95%CI: 0.62–0.75).

The additional subgroup analyses always confirmed the significant association of difficult ET with reduced clinical pregnancy rate. We failed to identify any subgroup that did not show this effect. Of interest is the observation that the effect is independent from the local rate of success and the frequency of difficult ET. The negative effect was identified in both Centers with higher and lower rate of success and in those with higher and lower rate of difficult ET. Based on this latter finding, one is tempted to speculate that the expertise of the team (that may be reflected by a lower rate of difficult ET) may ultimately have clinically relevant benefits. To note, there is evidence from intra-group comparisons that the rate of success may differ among physicians of the same center[27].

The main objective of the ET is to gently deposit the embryos inside the uterine cavity and in a correct position to maximize the chance of implantation. The American Society for Reproductive Medicine (ASRM) guidelines describe better pregnancy rates with several measures, such as the use of abdominal ultrasound during the transfer, the removal of cervical mucus, the use of a soft catheter and the deposition of the embryo at about 1–2 cm from the uterine fundus[2]. Recently, D'Angelo et al.[3] provided for ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) an overview of technical aspects of ET, including the preparation prior to ET, the procedure itself, the post-procedure care, and the importance of the physicians' performance. Their recommendation overall overlap with those of the ASRM. Surprisingly, both papers do not deal with the situation of difficult ET. In most cases, this situation is unexpected and the physician performing the transfer must contravene to the dogma of gentleness. He may need hard catheter or must use a tenaculum. No recommendation is given to guide the physician in this common situation. This is surprising since at least two approaches may deserve attention. First, one may consider oxytocin receptor antagonists that can temper uterine contractions. There is evidence that atosiban or other agents of the same family may increase the success rate of ET, in particular in women with repeated implantation failure[1,28]. However, the possibility to use this drug exclusively in cases of difficult embryo transfer, after the difficult but definitive insertion of the catheter but prior to the release of the embryos has not been investigated. In our opinion, this approach may be rational and deserves investigation. Second, one may consider suspending the transfer, freezing the embryos, and postponing the procedure to the following month (transforming the transfer in a mock transfer). This is harsher for the women and may require to re-freeze embryos that were just thawed. However, it allows the following month to be more prepared, involving most expert physicians, and knowing in advance the possible difficulties, the trajectory that the catheter should follow, and the most suitable catheter to use. Randomized Controlled Trial are required, but the stake is clinically valuable, considering that these interventions may potentially increase in the rate of success in this population with an OR of 1.4 (1/0.7). The scant attention given to this topic is surprising.

Some strengths and limitations of this meta-analyses deserve to be recognized and discussed. Considering the former, this is the largest systematic review and meta-analysis on the impact of difficult embryo transfer on reproductive outcomes. The previous one included one third of the papers selected for the present one (5 compared to 15). Moreover, evidence is rather consistent, and heterogeneity is generally limited, supporting the robustness of our conclusions.

On the other hand, some limitations should be acknowledged. First, the criteria used for defining difficult ET are not precise. Most refers to the need for additional measures, a pragmatic but imprecise and poorly reproducible definition. Not surprisingly, despite a similar theoretical definition ("needs for additional measures"), the rate markedly differed among selected studies, varying between 7 and 32%. A second limitation is that a considerable portion of the data is from only two studies[12,18]. However, when excluding these two studies, the significant association remained, and the magnitude was similar (data not shown). Third, the quality of the available evidence is not optimal. Even if the Newcastle–Ottawa Quality Assessment Scale quoted well all the included studies, none of them reached the standards to be defined of moderate-high quality according to the GRADE system. Moreover, data on live birth rate (the gold standard for studies on IVF) was available in less than half of the studies. However, given the specific query of this study (implantation of the embryo), we do not deem this limit

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

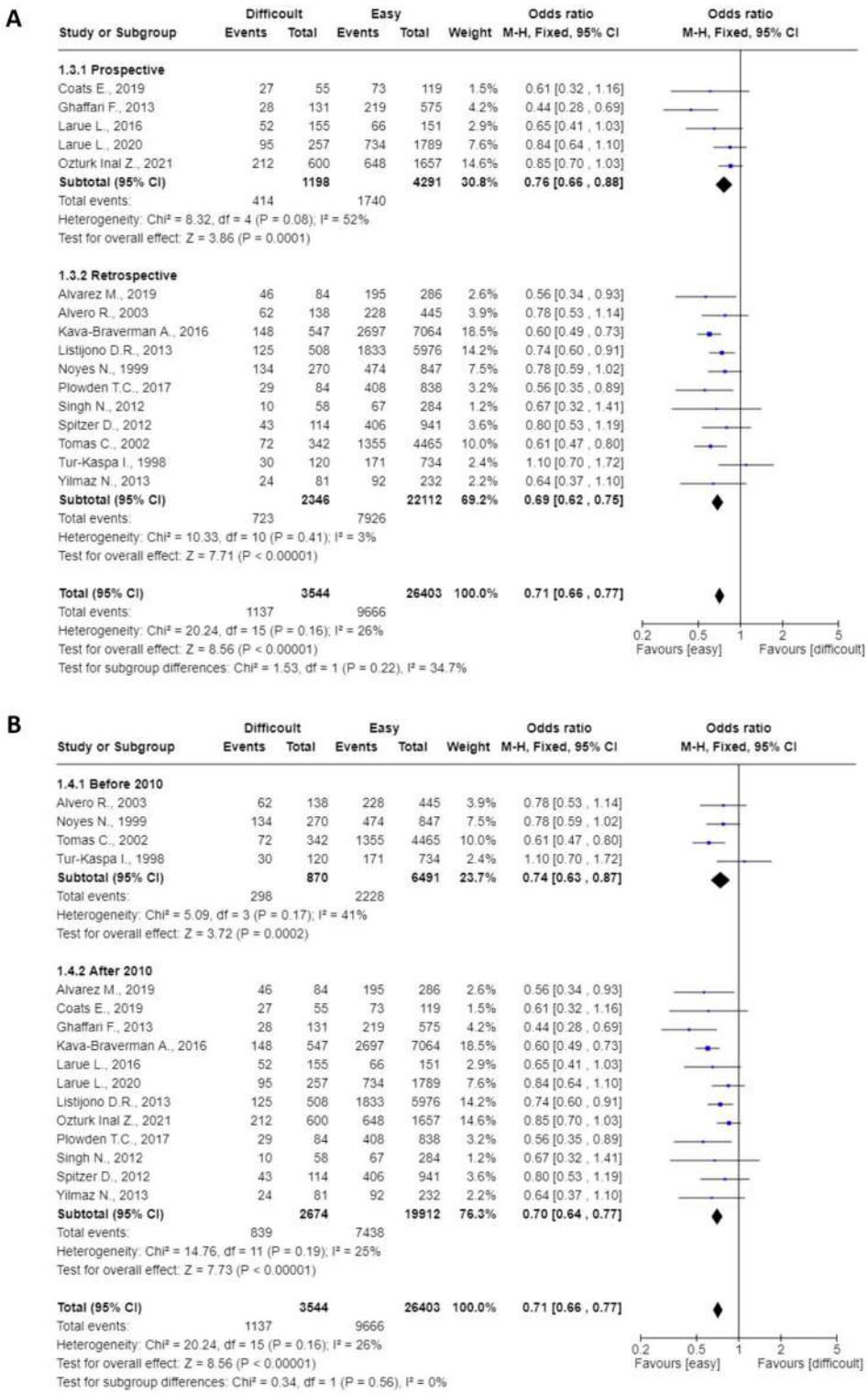


Figure 4. (**A**) mode of recruitment (retrospective or prospective); (**B**) study period (divided according to the date of publication, before and after 2010); (**C**) type of catheter (Cook or Wallace catheters); (**D**) frequency of difficult cases (using the median to divide into two groups); (**E**) CPR in the control group (using the median to divide into two groups).

of major relevance and, therefore, we decided a priori for clinical pregnancy rate rather than live birth rate as a primary outcome. Fourth, the clinical policies of the different studies varied widely. Of utmost relevance here is

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

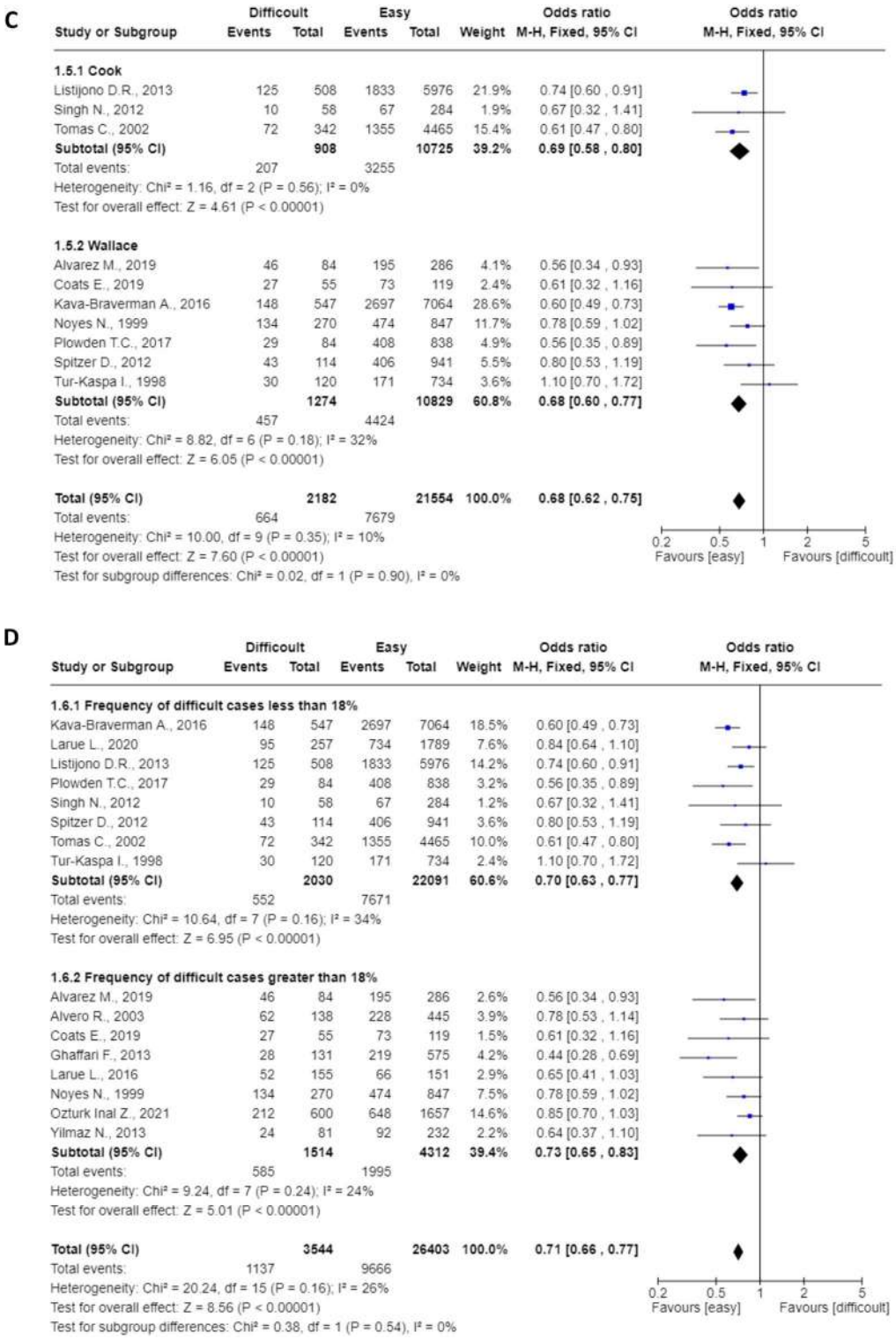


Figure 4. (continued)

the inclusion of fresh and frozen cycles and, among the latter, of both women treated with hormone replacement therapy and natural cycles. We cannot exclude that the impact of difficult ET on the rate of success may vary according to the clinical conditions associated to the transfer. We could not assess this important aspect in our meta-analysis. Finally, our observational design does not allow us to infer a causal relation between the need for additional maneuvers and the chance of success. We cannot exclude that the anatomical peculiarities making the transfer more difficult may also impair on their own the implantation of the embryo. An RCT comparing

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

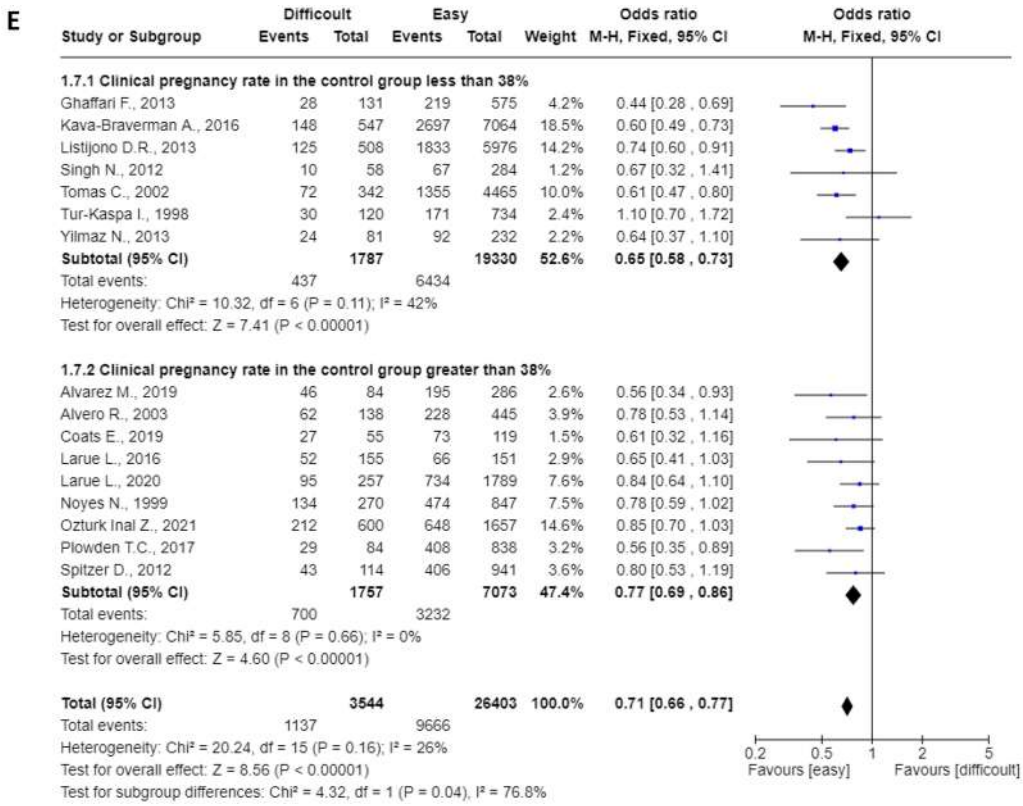


Figure 4. (continued)

gentle and aggressive techniques of transfer would be necessary to provide a definitive answer, but this type of study would be ethically debatable.

In conclusion, our study indirectly supports the idea that the ET should be done gently, trying to avoid the use of additional instruments that can facilitate the access to the endometrial cavity but can concomitantly affect the implantation of the embryo. Given the importance of the ET as the final step of the IVF cycles, every effort should be made to optimize the procedure, to predict and reduce the likelihood of encountering difficulties and to overcome the detrimental secondary effects in case of a difficult access. Further studies should be designed to achieve this crucial goal that may allow to significantly improve IVF outcomes.

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 30 March 2023; Accepted: 5 December 2023
Published online: 14 December 2023

References

1. Tyler, B. *et al.* Interventions to optimize embryo transfer in women undergoing assisted conception: A comprehensive systematic review and meta-analyses. *Hum. Reprod. Update* **28**, 480–500 (2022).
2. Penzias, A. *et al.* Performing the embryo transfer: A guideline. *Fertil. Steril.* **107**, 882–896 (2017).
3. D'Angelo, A., Panayotidis, C., Alteri, A., Mcheik, S. & Veleva, Z. Evidence and consensus on technical aspects of embryo transfer. *Hum. Reprod. Open* **2022**, 4 (2022).
4. Busnelli, A., Somigliana, E., Cirillo, F., Baggiani, A. & Levi-Setti, P. E. Efficacy of therapies and interventions for repeated embryo implantation failure: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **11**, 1747 (2021).
5. Fanchin, R. & Ayoubi, J. M. Uterine dynamics: Impact on the human reproduction process. *Reprod. Biomed. Online* **18**, S57–S62 (2009).
6. Phillips, J. A. S., Martins, W. P., Nastri, C. O. & Raine-Fenning, N. J. Difficult embryo transfers or blood on catheter and assisted reproductive outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol.* **168**, 121–128. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.12.030 (2013).
7. David Atkins, D. B. *et al.* Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* **328**, 1490 (2004).
8. Higgins, J. P. T. *et al. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3. Cochrane* (2022). Available from https://www.training.cochrane.org/handbook.
9. DerSimonian, R. & Kacker, R. Random-effects model for meta-analysis of clinical trials: An update. *Contemp. Clin. Trials* **28**, 105–114 (2007).
10. DerSimonian, R. & Laird, N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin. Trials* **7**, 177–188 (1986).
11. Alvarez, M. *et al.* Effect of embryo transfer difficulty on live birth rates studied in vitrified–warmed euploid blastocyst transfers. *Reprod. Biomed. Online* **39**, 940–946 (2019).

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

12. Kava-Braverman, A. *et al.* What is a difficult transfer? Analysis of 7,714 embryo transfers: The impact of maneuvers during embryo transfers on pregnancy rate and a proposal of objective assessment. *Fertil. Steril.* **107**, 657-663.e1 (2017).
13. Alvero, R., Hearns-Stokes, R. M., Catherino, W. H., Leondires, M. P. & Segars, J. H. The presence of blood in the transfer catheter negatively influences outcome at embryo transfer. *Hum. Reprod.* **18**, 1848–1852 (2003).
14. Coats, E. *et al.* Qualifying the difficulty of embryo transfer with a visual analogue scale and assessing its impact on IVF outcomes. *Hum. Fertil.* **22**, 177–181 (2019).
15. Ghaffari, F., Kiani, K., Bahmanabadi, A. & Akhoond, M. *Comparison of Easy and Difficult Embryo Transfer Outcomes in In Vitro Fertilization Cycles Int. J. Fertil. Steril.* **6**, 232–237 (2013).
16. Larue, L. *et al.* Evaluation of a strategy for difficult embryo transfers from a prospective series of 2,046 transfers. *F S Rep.* **2**, 43–49 (2021).
17. Larue, L. *et al.* Causes anatomiques des transferts embryonnaires difficiles en FIV. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* **46**, 77–86 (2017).
18. Listijono, D. R., Boylan, T., Cooke, S., Kilani, S. & Chapman, M. G. An analysis of the impact of embryo transfer difficulty on live birth rates, using a standardised grading system. *Hum. Fertil.* **16**, 211–214 (2013).
19. Noyes, N., Licciardi, F., Grifo, J., Krey, L. & Berkeley, A. *In Vitro Fertilization Outcome Relative To Embryo Transfer Difficulty: A Novel Approach to the Forbidding Cervix* (1999).
20. Plowden, T. C. *et al.* Does the presence of blood in the catheter or the degree of difficulty of embryo transfer affect live birth?. *Reprod. Sci.* **24**, 726–730 (2017).
21. İnal, Z. Ö. & İnal, H. A. The effect of embryo transfer technique on pregnancy rates in in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection cycles: A prospective cohort study. *Turk. J. Obstet. Gynecol.* **18**, 30–36 (2021).
22. Singh, N., Gupta, P., Mittal, S. & Malhotra, N. Correlation of technical difficulty during embryo transfer with rate of clinical pregnancy. *J. Hum. Reprod. Sci.* **5**, 258–261 (2012).
23. Spitzer, D. *et al.* Effects of embryo transfer quality on pregnancy and live birth delivery rates. *J. Assist Reprod. Genet.* **29**, 131–135 (2012).
24. Tomás, C., Tikkinen, K., Tuomivaara, L., Tapanainen, J. S. & Martikainen, H. The degree of difficulty of embryo transfer is an independent factor for predicting pregnancy. *Hum. Reprod.* **17**, 14. https://academic.oup.com/humrep/article/17/10/2632/607745 (2002).
25. Tur-Kaspa, I. *et al.* Difficult or repeated sequential embryo transfers do not adversely affect in-vitro fertilization pregnancy rates or outcome. *Hum. Reprod.* **13**, 2452 (1998).
26. Yilmaz, N. *et al.* Effect of the afterloaded external guidance embryo transfer technique on pregnancy rates in single embryo transfer cycles. *J. Turk. German Gynecol. Assoc.* **14**, 153–156 (2013).
27. Cirillo, F. *et al.* The human factor: Does the operator performing the embryo transfer significantly impact the cycle outcome?. *Hum. Reprod.* **35**, 275–282 (2020).
28. Neumann, K. & Griesinger, G. Is oxytocin receptor antagonist administration around embryo transfer associated with IVF treatment success? A systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed.* **43**, 2021 (2021).

Author contributions

G.G. conceived this systematic review and metaanalysis in consultation with E.S. and L.M. G.G., L.M and C. D. D. have collected data and carried out the systematic review. M.R. carried out the statistical analyses. G.G. wrote the first draft of the manuscript. E.S. and L.M. provided criticism of the manuscript. All authors reviewed the manuscript and approved the final version for submission.

Funding

The study was partially funded by Italian Ministry of Health—Current Research IRCCS.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-023-49141-x.

Correspondence and requests for materials should be addressed to G.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2023

Importance of preovulatory estradiol on uterine receptivity and luteal function

George Allen Perry[1]*, Jaclyn Nicole Ketchum[1,2], Lacey Kay Quail[1,2]

[1]Texas A&M AgriLife Research, Overton, Texas, United States of America
[2]Department of Animal Science, Texas A&M University, College Station, Texas, United States of America

How to cite: Perry GA, Ketchum JN, Quail LK. Importance of preovulatory estradiol on uterine receptivity and luteal function. Anim Reprod. 2023;20(2):e20230061. https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0061

Abstract

Animals that exhibited estrus had greater pregnancy success compared to animals that did not exhibit estrus before fixed-time AI (FTAI). Estradiol is synthesized in bovine ovarian follicles under gonadotropin regulation and can directly and indirectly regulate the uterine receptivity and luteal function. Estradiol concentrations at FTAI impacted oviductal gene expression and has been reported to play an important role in establishing the timing of uterine receptivity. These changes have been reported to impact uterine pH and sperm transport to the site of fertilization. After fertilization, preovulatory estradiol has been reported to improve embryo survival likely by mediating changes in uterine blood flow, endometrial thickness and changes in histotroph. Cows with greater estradiol concentrations at the time of GnRH-induced ovulation also had a larger dominant follicle size and greater circulating progesterone concentrations on day 7. Therefore, it is impossible to accurately determine the individual benefit of greater estradiol concentrations prior to ovulation and greater progesterone concentrations following ovulation to pregnancy establishment, as these two measurements are confounded. Research has indicated an importance in the occurrence and timing of increasing preovulatory concentrations of estradiol, but increasing estradiol concentrations by supplementation may not be sufficient to increase fertility. Increased production of estradiol by the preovulatory follicle may be required to enhance fertility through the regulation of sperm transport, fertilization, oviductal secretions, the uterine environment, and embryo survival.

Keywords: estradiol, uterus, corpus luteum, oviduct.

Introduction

Estrous synchronization and AI remain an important and widely applicable reproductive biotechnology available for cattle (Seidel, 1995). However, time and labor deter its widespread utilization. With development of FTAI protocols, estrus detection is not necessary as a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist can cause ovulation (Ryan et al., 1998). Nevertheless, successful implementation of a FTAI protocol requires a large proportion of females to express estrus, as a positive relationship between estrus expression at time of insemination and pregnancy success has been established in both beef and dairy cattle (Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2005; Lopes et al., 2007; Perry et al., 2007). Animals that exhibited estrus averaged 27% greater pregnancy success compared to animals that did not (Richardson et al., 2016). Furthermore, the technology of embryo transfer provides the opportunity to increase the quantity of genetically superior offspring in a shorter period of time (Lohuis, 1995; Hasler, 2014); however, for this technology to be successful, recipient females need to express estrus as pregnancy per embryo transfer (P/ET) are greater among estrual recipients (Baruselli et al., 2003; Bó and Cedeño, 2018).

*Corresponding author: george.perry@ag.tamu.edu
Received: May 4, 2023. Accepted: July 18, 2023.
Financial support: This project was funded in part by the Multistate Hatch project 9835.
Conflicts of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Copyright © The Author(s). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Estradiol is synthesized in bovine ovarian follicles under gonadotropin regulation, described by the two cell-two gonadotropin model (Fortune and Quirk, 1988). Preovulatory estradiol has several physiological roles in pregnancy establishment, including the expression of estrus (Coe and Allrich, 1989), induction of the preovulatory gonadotropin surge (Chenault et al., 1975), facilitating the transport of sperm (Hawk and Cooper, 1975), and inducing endometrial progesterone receptors (Zelinski et al., 1982).

The role of estradiol in regulating fertility

Estrus

Estrus refers the time period when a female is sexually receptive. Standing estrus refers to the behavioral response of a female standing to be mounted by a male or another female. Initiation of estrus occurs due to increased circulating concentrations of estradiol when progesterone concentrations are low (Allrich, 1994). Among cattle, concentrations of estradiol peak approximately 36 hours before ovulation (Chenault et al., 1975), and increased preovulatory concentrations of estradiol have been correlated with increased pregnancy success (Perry et al., 2005). Furthermore, estrus expression, when compared to no estrus expression, reduced pregnancy loss from day 32 to day 60 following FTAI (Pereira et al., 2014). While expression of estrus contributes to the establishment of pregnancy, there has been no repeatability of expression of estrus reported (Richardson et al., 2016).

Oviduct

The oviductal environment is unique and governed by steroid hormones throughout the estrous cycle. Lipid and enzyme production by the oviductal epithelium increases in response to estradiol (Witkowska, 1979), and oviductal fluid during estrus also contains a sperm capacitation factor (Parrish et al., 1989). Perhaps most notably, oviductal glycoprotein secretion is maximized at estrus (Stanke et al., 1974; Malayer et al., 1988) in response to estradiol associating with its stromal receptor (Nancarrow and Hill, 1994). Estrus-associated glycoprotein is produced by both the ampulla and isthmus regions of the bovine oviduct (Boice et al., 1990), and interacts with spermatozoa (King and Killian, 1994) and oocytes (Wegner and Killian, 1991) in such a way that improves fertilization, cleavage rates, and blastocyst formation in a dose-dependent manner (Hill et al., 1996; Martus et al., 1998). Additionally, when cyclic ewes were ovariectomized, production of estrus-associated glycoprotein was abolished, but administration of estradiol benzoate (EB) restored estrus-associated glycoprotein production (Sutton et al., 1986).

In addition to changes in oviductal fluid, oviductal gene expression is different across the estrous cycle, such that expression of 37 genes related to protein secretion and modification were upregulated during estrus compared to diestrus in the oviduct of heifers (Bauersachs et al., 2003). More specifically, expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 (MPGES-1) mRNA, a member of the prostaglandin family known for regulation of ovulation, fertilization, and implantation (Lim et al., 1997) as well as oviductal contraction (Wijayagunawardane et al., 2001), was greater during periods of estrogen dominance compared to progesterone dominance in all regions of the bovine oviduct (Gauvreau et al., 2010). Additionally, loss of the oviductal estrogen receptor increases protease activity, which subsequently results in embryonic mortality within the first two days of pregnancy (Winuthayanon et al., 2015).

Estradiol concentrations at FTAI impact oviductal gene expression, such that 1386 and 61 genes were up- and down-regulated, respectively, at the ampullary-isthmic junction, while 349 and 202 genes were up- and down-regulated, respectively, in the isthmus of cows with increased circulating estradiol concentrations (Quail et al., 2021). More specifically, KEGG pathways associated with metabolism and hormone signaling were associated with up-regulated genes at the ampullary-isthmus junction, while up-regulated genes in the isthmus were associated with the cell adhesion KEGG pathway in cows with increased estradiol concentrations at FTAI (Quail et al., 2021).

Uterine environment

Estradiol has been reported to play an important role in establishing the timing of uterine receptivity (Ozturk and Demir, 2010). The uterine environment is necessary to fertilization, early embryo development, recognition of pregnancy, as well as conceptus elongation and attachment. During the estrous cycle, endometrial changes in composition and differentiation are regulated by estradiol, progesterone, and oxytocin (Spencer and Bazer, 2004), and the timing of these changes is critical to embryo survival. Thus, estradiol plays an important role in establishing the timing of uterine receptivity (Ozturk and Demir, 2010). In cattle, synchrony between the embryo and uterus must be ± 24 hours (Hasler, 2001).

Uterine gene expression

A study conducted by Zelinski et al. (1982) concluded that estradiol induces synthesis of endometrial cytoplasmic estrogen and progesterone receptors (Zelinski et al., 1982), which further supports work from (Koligian and Stormshak, 1977) concluding progesterone inhibited the replenishment of cytoplasmic estradiol receptors during the luteal phase in the ovine endometrium. More recently, it has been reported that progesterone receptors in the deep glandular epithelium, as well as endometrial estradiol receptor (ERα) mRNA, were up-regulated on day 15.5 in cows with elevated preovulatory estradiol concentrations (Bridges et al., 2012).

Differences also exist in endometrial and corpus luteum (CL) gene expression between estrual and nonestrual females, with endometrial transcripts related to prostaglandin synthesis (OTR and COX-2) as well as the immune system and cell adhesion (CXCL10, IGLL1, MX1, MX2, MMP19, MYL12A, and SLPI) influenced by the expression of estrus (Davoodi et al., 2016). Furthermore, the abundance of facilitative and sodium-dependent glucose transporters, which are responsible for altering the composition of uterine luminal fluid (ULF) and providing glucose to the developing conceptus, is impacted by estradiol, such that females with elevated preovulatory estradiol concentrations had a greater abundance of SLC2A1 and SLC5A1 in both intercaruncular and caruncular tissues (Northrop et al., 2018).

The TGF-β superfamily is involved in endometrial changes, placental development, and pregnancy maintenance (Jones et al., 2006). At estrus, there is also up-regulation of several genes involved in remodeling the extracellular matrix (Bauersachs et al., 2005), as well as changes in expression of inhibin A subunit (a member of the TGF-β signaling pathway) in the bovine intercaruncular area, suggesting the involvement of estradiol in coordinating endometrial remodeling (Ishiwata et al., 2003). Milk protein (SERPINA14) is expressed in the endometrium of ruminants during pregnancy, and is likely involved in nutrition of the embryo/fetus, embryonic/fetal growth, and suppression of the maternal immune system (Ing and Roberts, 1989). Expression of SERPINA14, as determined by Real-time RT-PCR, was greatest on the day of estrus, and was also up-regulated after stimulation with estradiol. Furthermore, detection of the SERPINA14 protein revealed the protein was localized to the glandular epithelium and was increased on the day of estrus (Ulbrich et al., 2009). This suggests a possible preparatory role for preovulatory estradiol in establishing a uterine environment that is conducive to pregnancy.

CLOCK genes regulate biological oscillations and the transcription of other genes in a tissue specific manner in response to changes in nutrient status, day length, and possibly other environmental influences (Albrecht, 2006). Decreased litter size, lower frequency of successful matings, and increased cycle length have been reported in ClockΔ19 (mice in which CLOCK is not functional) female mice (Chappell et al., 2003). When ClockΔ19 female mice were treated hormonally to induce ovulation and mated with fertile males, ClockΔ19 females produced fewer embryos than control females (Kennaway, 2005). From these results, it is possible that circadian clock gene defects at the level of the uterus may disrupt the synchrony between the uterine environment and the developing embryo. He et al. (2007) reported that Period 1 mRNA (part of the positive feedback loop of CLOCK) was expressed in the uterus of diestrus rats, and that both estradiol and progesterone stimulated uterine Period 1 mRNA expression in ovariectomized rats. Furthermore, Nakamura et al. (2005) reported that estradiol altered the normal circadian rhythms in the uterus. Therefore, the circadian clock genes may influence fertility at the uterine level.

Uterine pH

In estrual females, there was a transient decline in uterine pH from 36 hours prior to the onset of estrus until estrus. From the onset of estrus to approximately 6 hours after the onset of estrus, uterine pH increased rapidly. Neither the decrease in uterine pH prior to estrus, nor the rise after estrus was observed in females that did not express estrus (Perry and Perry, 2008a). Overall, females expressing estrus had a decreased uterine pH (pH = 6.72) compared to females that did not express estrus (pH = 7.0). The effect of preovulatory estradiol on uterine pH was evaluated in females that were or were not treated with 1 mg of estradiol cypionate (ECP) 36 hours prior to the final administration of GnRH in a CO-Synch protocol. Nonestrual females that did not receive ECP had an elevated uterine pH (7.0 ± 0.07) compared to estrual females that were not administered ECP (pH = 6.72 ± 0.10; P = 0.02) and nonestrual females that were administered ECP (6.81 ± 0.09; P = 0.06; Perry and Perry, 2008b). Bolzenius et al. (2016) reported that as uterine pH decreased at the time of FTAI, pregnancy rates increased. They also noted that NA+/H+ exchanger isoforms 1, 2, and 3 played a role in altering uterine pH during the onset of estrus (Bolzenius et al., 2016). Given that Jones and Bavister (2000) reported that as pH decreased, motility of bull sperm decreased and longevity increased, a transient change in uterine pH around estrus may provide a mechanism for increasing sperm longevity in the reproductive tract.

Hawk (1983) reported that in order for sperm to be efficiently transported in the female reproductive tract, females needed exposure to estradiol. At initiation of estrus, uterine pH was decreased which may have led to greater longevity of sperm through a transient decrease in motility (Wong et al., 1981). The peak in uterine pH observed 6 hours after estrus may play a role in aiding sperm transport, as Goltz et al., (1988) reported as pH increased, so did sperm motility (Goltz et al., 1988). Cows that initiated standing estrus had decreased uterine pH (6.78) and increased pregnancy success (52%) compared to cows that did not initiate standing estrus, but were induced to ovulate (6.96 and 38%, respectively). This increase in pregnancy success among cows that exhibited standing estrus is likely due to increased sperm transport to the site of fertilization (Larimore et al., 2015). In a FTAI scenario, the second administration of GnRH can induce ovulation approximately 30 hours after administration in the absence of elevated estradiol concentrations (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999), and sperm survival until ovulation may be compromised as the interval from insemination to ovulation is lengthened.

Fertilization

A review by Santos et al. (2004) reported fertilization failure in lactating beef and dairy cows was as high as 45%. A study in beef cows, where embryos were flushed from cows with high or low estradiol concentrations at the time of FTAI, revealed that cows with greater concentrations of estradiol at GnRH-induced ovulation were more likely to yield a fertilized embryo than an unfertilized oocyte (Jinks et al., 2013). Additionally, animals that exhibited estrus prior to FTAI had increased accessory sperm numbers and improved embryo quality compared to animals that did not exhibit estrus (Larimore et al., 2015). Although accessory sperm are not involved in fertilization, they represent sperm that were able to access the oviduct, undergo capacitation and the acrosome reaction, recognize and bind to the oocyte, and partially penetrate the zona pellucida (Dalton et al., 2006). The number of accessory sperm trapped in the zona pellucida has been positively associated with fertility (Hunter and Wilmut, 1984; Hawk and Tanabe, 1986; DeJarnette et al., 1992; Nadir et al., 1993), and are thought to be an indirect measure of both sperm transport and the availability of competent sperm competing for fertilization (DeJarnette et al., 1992).

Uterine blood flow

Endocrine, paracrine, and autocrine factors are all involved in the development and growth of the embryo and placenta. The bovine fetus receives nutrients through both hematotroph and histotroph. Hematotroph allows exchange of nutrients between fetal and maternal

circulation (Bazer et al., 1990). When transrectal doppler ultrasonography was used to characterize uterine blood flow, circulating concentrations of estradiol were determined to be greatest on day -2 (day 0 = ovulation) and uterine blood flow was greatest on day -3 (Bollwein et al., 2000). Similarly, a positive correlation between circulating concentrations of estradiol and uterine blood flow as well as uterine artery diameter were determined following administration of EB (10 mg; Rawy et al., 2018). Blood flow increased two days prior to estrus, and remained elevated until the day after estrus, which corresponded with elevated estradiol concentrations (Ford and Chenault, 1981).

Uterine blood flow was similar in pregnant and nonpregnant cows up to 13 days post-mating, at which time blood flow to the gravid horn increased. From day 25 to day 30, blood flow increased to the gravid horn and decreased to the nongravid horn. Progesterone concentrations and uterine blood flow to the gravid horn was positively correlated. The increase in blood flow to the gravid horn, caused by the preimplantation conceptus, was similar to blood flow observed when estradiol was elevated (Ford and Chenault, 1981). The increase in blood flow may also increase the blood flow to the CL found on the ipsilateral ovary, thereby increasing progesterone secretion which would aid in maintaining pregnancy (Ford and Chenault, 1981).

Uterine endometrial thickness

Sugiura et al. (2018) reported that as progesterone concentrations decrease, endometrial thickness increased; however, estradiol may also play a role in sustaining and/or enhancing these changes, as endometrial thickness was strongly correlated with the Estradiol:Progesterone ratio after natural and induced estrus (Sugiura et al., 2018). Endometrial thickness was measured by transrectal ultrasonography in lactating Holstein cows administered the Ovsynch protocol. Thickness of the endometrium increased from 7 to 9.5 mm following prostaglandin administration, remained thick (> 9 mm) for two days, and then became thinner on both day 1 (8 mm) and 2 (7.4 mm) following the second administration of GnRH. Supplementing estradiol-17β (1mg) eight hours prior to the second administration of GnRH increased pregnancies to AI in females with thinner endometrium. However, in females that had an endometrial thickness measurement of > 8 mm 48 hours following prostaglandin administration, estradiol supplementation did not improve pregnancies to AI (Souza et al., 2011).

Histotroph

Uterine histotroph is composed of nutrients, growth factors, proteins, glucose, immunosuppressive agents, enzymes, and ions. It is secreted by the endometrium and is necessary for early conceptus growth/survival (Geisert et al., 1992; Gray et al., 2001). Any changes can greatly influence early embryonic viability. In particular, glucose is a major fuel source used by the conceptus for growth and development. Animals that exhibited estrus during a FTAI protocol had greater glucose concentrations in the ULF compared to nonestrual animals (Northrop et al., 2018). When administration of estrogen, corresponding with initiation of estrus, was omitted in ovariectomized, hormone-supplemented ewes, embryo survival following embryo transfer (Miller and Moore, 1976), uterine weight, uterine protein, RNA to DNA ratio, and the rate of protein synthesis were decreased (Miller et al., 1977).

Overall, cows that exhibited standing estrus around the time of FTAI had increased preovulatory concentrations of estradiol (Perry et al., 2005; Perry and Perry, 2008a; Perry and Perry, 2008b), decreased uterine pH (Perry and Perry, 2008a; Perry and Perry, 2008b), increased sperm transport (Larimore et al., 2015), and increased pregnancy success (Perry et al., 2005) compared to nonestrual cows. Consequently, preovulatory concentrations of estradiol may play a major role in the uterine environment as well as the establishment and maintenance of pregnancy.

Subsequent progesterone effects

Two of the most important factors involved in the establishment of pregnancy are the circulating estradiol concentration preceding GnRH-induced ovulation and circulating progesterone concentration on day 7 following ovulation (Atkins et al., 2013; Jinks et al., 2013). However, cows with greater estradiol concentrations at the time of GnRH-induced ovulation also have a larger dominant follicle size and greater circulating progesterone concentrations on day 7 (Jinks et al., 2013). Among dairy cows, cows that ovulated small follicles (10 to 15 mm) had decreased concentrations of progesterone on day 7 (Sartori et al., 2006) and cows that were AIed with decreased concentrations of progesterone on day 7 had decreased P/AI, but when embryos were transferred there was no relationship between concentrations of progesterone and P/ET (Sartori et al., 2006; Demetrio et al., 2007). Therefore, the direct impact of increase preovulatory estradiol likely occurs in the oocyte during final maturation or in early embryo development before day 7.

The preovulatory follicular environment is important for preparing follicular cells for luteinization and secretion of progesterone (McNatty et al., 1975). McNatty et al. (1979) suggested that development of a normal CL depends on a follicle meeting the following criteria: 1) an adequate number of granulosa cells, 2) an adequate number of luteinizing hormone (LH) receptors on the granulosa and theca cells, and 3) granulosa cells capable of synthesizing adequate amounts of progesterone following luteinization. Within granulosa cells, estradiol is reported to cause: 1) increased cellular proliferation (Goldenberg et al., 1972; Parrott and Skinner, 1998; Dupont et al., 2000), 2) formation of gap junctions (Merk et al., 1972; Burghardt and Anderson, 1981), 3) increased stimulatory action of follicle-stimulating hormone (FSH) on aromatase activity (Adashi and Hsueh, 1982; Zhuang et al., 1982; Reilly et al., 1996), 4) enhanced stimulation of progesterone synthesis following gonadotropin stimulation (Welsh et al., 1983; Fanjul et al., 1984), and 5) enhanced acquisition of LH receptors (Kessel et al., 1985; Farookhi and Desjardins, 1986; Wang and Greenwald, 1993). Furthermore, luteinized granulosa cells secreted increased progesterone when they were collected from follicles having increased estradiol concentrations compared to granulosa cells from follicles that had decreased estradiol concentrations (McNatty et al., 1979).

The relationship between pregnancy success and circulating concentrations of progesterone during early pregnancy in cattle is equivocal, as luteal secretion of progesterone is required for the survival of the embryo/fetus (McDonald et al., 1952). Several studies have reported elevated concentrations of progesterone in pregnant cows compared to nonpregnant cows beginning as early as day 4 (Butler et al., 1996) or day 6 (Henricks et al., 1971; Erb et al., 1976) after insemination. Furthermore, cows that had an earlier rise in progesterone had embryos that were more advanced developmentally, produced more interferon τ (INF-τ), and were capable of inhibiting the prostaglandin $F_{2\alpha}$ release on day 16 after breeding (Kerbler et al., 1997; Mann et al., 1998; Mann and Lamming, 2001). Similarly, cows supplemented with progesterone during early gestation had advanced endometrial expression of several genes associated with uterine secretion and conceptus development (Forde et al., 2009; Forde et al., 2010). It is speculated that progesterone induces changes in endometrial gene expression, leading to changes in uterine histotroph composition (Spencer et al., 2008). Bartol et al. (1981) determined that protein accumulation within the uterine lumen is related to duration of progesterone stimulation. However, direct supplementation of progesterone following insemination has produced varying results. Some studies have reported a 10 to 60% increase in P/AI following progesterone supplementation (Robinson et al., 1989; Macmillan and Peterson, 1993), but others using sheep (Diskin and Niswender, 1989; Nephew et al., 1994) and cattle (Walton et al., 1990; Van Cleeff et al., 1991; Monteiro et al., 2015) have reported no benefit or even decreased P/ET (Monteiro et al., 2015) of progesterone supplementation on pregnancy success.

Atkins et al. (2013) reported that estradiol concentrations at GnRH-induced ovulation (day 0) affected day 27 P/ET of recipient cows independently of progesterone concentrations on day 7. Furthermore, work from our laboratory has reported that when ovulatory follicle size was controlled, there was no difference in day 10 CL weight, circulating concentrations of progesterone, or expression of luteal steroidogenic enzymes between cows exhibiting standing

estrus and nonestrual cows (Fields et al., 2012). Plasma progesterone concentrations on day 7 (day 0 = induced ovulation) can be positively associated with the probability of pregnancy only when preovulatory estradiol concentrations were low. The association between plasma progesterone concentrations on day 7 and pregnancy was not observed when concentrations of preovulatory estradiol were high (Ciernia et al., 2021). Interestingly, on day 17, pregnant cows were reported to have greater progesterone concentrations compared to nonpregnant cows when females had: 1) decreased preovulatory estradiol and decreased subsequent progesterone, 2) decreased preovulatory estradiol and normal subsequent progesterone, or 3) increased preovulatory estradiol and decreased subsequent progesterone. However, among cows classified as having increased preovulatory estradiol and normal subsequent progesterone, progesterone concentrations on day 17 did not differ between pregnant and nonpregnant cows (Ciernia et al., 2021). Therefore, improved pregnancy success among cattle with elevated preovulatory concentrations of estradiol are likely independent of the impact of progesterone on the uterine environment during the subsequent estrous cycle.

Early embryo development and survival

When estrogen administration, corresponding with initiation of estrus, was omitted in ovariectomized, hormone-supplemented ewes, embryo survival following embryo transfer was decreased (Miller and Moore, 1976). In a recent study from our laboratory, ovariectomized cows received exogenous hormones to mimic the luteal phase and luteolysis, and then received either ECP, EB, or no treatment (CON) to mimic the preovulatory period. Ovulation was stimulated with administration of GnRH (100 μg; day 0), and embryos were transferred on day 7. Cows that received preovulatory estradiol exposure (ECP or EB) had greater pregnancy establishment and embryonic survival compared to animals not receiving preovulatory estradiol exposure (4%, 29%, and 21% for CON, EB, and ECP, respectively; (Madsen et al., 2015). Additionally, preovulatory estradiol has been reported to have a positive impact on conceptus development, such that cows exhibiting estrus have increased conceptus length compared to nonestrual cows on day 19 of gestation (Davoodi et al., 2016). Since a larger conceptus would occupy a greater amount of luminal space, INF-τ stimulated gene expression may be enhanced, which may be beneficial to pregnancy. Furthermore, in day 19 conceptuses of females expressing estrus, there were four genes that were differentially expressed (*ISG15*, *PLAU*, *BMP15*, and *EEF1A1*; Davoodi et al., 2016). These results indicate that changes in reproductive gene expression around the preimplantation period were favorable towards the elongating conceptus given the expression of estrus near FTAI.

Conclusion

These studies indicate not only an importance in occurrence and timing of increasing preovulatory concentrations of estradiol, but also and that increasing estradiol concentrations by supplementation may not be sufficient to increase fertility. Increased production of estradiol by the preovulatory follicle may be required to enhance fertility through the regulation of sperm transport, fertilization, oviductal secretions, the uterine environment, and embryo survival.

Acknowledgements

This work was partially funded by Multistate Hatch (project 9835).

References

Adashi EY, Hsueh AJ. Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. J Biol Chem. 1982;257(11):6077-83. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(20)65107-9. PMid:6804461.

Albrecht U. Orchestration of gene expression and physiology by the circadian clock. J Physiol Paris. 2006;100(5-6):243-51. http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2007.05.004. PMid:17643274.

Allrich RD. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. J Dairy Sci. 1994;77(9):2738-44. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77216-7. PMid:7814742.

Atkins JA, Smith MF, MacNeil MD, Jinks EM, Abreu FM, Alexander LJ, Geary TW. Pregnancy establishment and maintenance in cattle. J Anim Sci. 2013;91(2):722-33. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2012-5368. PMid:23148248.

Bartol FF, Thatcher WW, Lewis GS, Bliss EL, Drost M, Bazer FW. Effect of estradiol-17beta on PGF and total protein content in bovine uterine flushings and peripheral plasma concentration of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF(2alpha). Theriogenology. 1981;15(4):345-58. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(81)90002-9. PMid:16725594.

Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NA, Berber RA, Valentim R, Carvalho AFD Fo, Costa WP No. Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus) treated with" Ovsynch" protocol for fixed-time embryo transfer. Braz J Vet Res Anim Sci. 2003;40:96-106. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962003000800003.

Bauersachs S, Blum H, Mallok S, Wenigerkind H, Rief S, Prelle K, Wolf E. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. Biol Reprod. 2003;68(4):1170-7. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.102.010660. PMid:12606461.

Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Einspanier R, Wenigerkind H, Vermehren M, Blum H, Sinowatz F, Wolf E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. J Mol Endocrinol. 2005;34(3):889-908. http://dx.doi.org/10.1677/jme.1.01799. PMid:15956356.

Bazer FW, Terqui M, Martinat-Butte F. Physiological limits to reproduction. In: Proceedings of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production; 1990 Jul 23-27, Edinburgh, Scotland. Edinburgh: The University of Edinburgh; 1990. p. 292-8.

Bó GA, Cedeño A. Expression of estrus as a relevant factor in fixed-time embryo transfer programs using estradiol/progesterone-based protocols in cattle. Anim Reprod. 2018;15(3):224-30. http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0060. PMid:34178145.

Boice ML, Geisert RD, Blair RM, Verhage HG. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. Biol Reprod. 1990;43(3):457-65. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod43.3.457. PMid:2271726.

Bollwein H, Meyer HH, Maierl J, Weber F, Baumgartner U, Stolla R. Transrectal doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. Theriogenology. 2000;53(8):1541-52. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00296-X. PMid:10883842.

Bolzenius JK, Cushman RA, Perry GA. Expression of Na(+)/H(+) exchanger isoforms 1, 2, 3, and 4 in bovine endometrium and the influence of uterine pH at time of fixed-time AI of pregnancy success. Anim Reprod Sci. 2016;171:98-107. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.06.004. PMid:27338797.

Bridges GA, Mussard ML, Pate JL, Ott TL, Hansen TR, Day ML. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. Anim Reprod Sci. 2012;133(1-2):16-26. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.013. PMid:22789700.

Burghardt RC, Anderson E. Hormonal modulation of gap junctions in rat ovarian follicles. Cell Tissue Res. 1981;214(1):181-93. http://dx.doi.org/10.1007/BF00235155. PMid:7471172.

Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. J Anim Sci. 1996;74(4):858-65. http://dx.doi.org/10.2527/1996.744858x. PMid:8728008.

Chappell PE, White RS, Mellon PL. Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. J Neurosci. 2003;23(35):11202-13. http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-35-11202.2003. PMid:14657179.

Chenault JR, Thatcher WW, Kalra PS, Abrams RM, Wilcox CJ. Transitory changes in plasma progestins, estradiol, and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. J Dairy Sci. 1975;58(5):709-17. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84632-7. PMid:1170219.

Ciernia LA, Perry GA, Smith MF, Rich JJ, Northrop EJ, Perkins SD, Green JA, Zezeski AL, Geary TW. Effect of estradiol preceding and progesterone subsequent to ovulation on proportion of postpartum beef cows pregnant. Anim Reprod Sci. 2021;227:106723. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106723. PMid:33621845.

Coe BL, Allrich RD. Relationship between endogenous estradiol-17 beta and estrous behavior in heifers. J Anim Sci. 1989;67(6):1546-51. http://dx.doi.org/10.2527/jas1989.6761546x. PMid:2768112.

Dalton JC, Nadir S, Noftsinger M, Bame J, Saacke RG. Management factors associated with male fertility. In: Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle; 2006; Rapid City, United States. 2006. p. 279-290.

Davoodi S, Cooke RF, Fernandes AC, Cappellozza BI, Vasconcelos JL, Cerri RL. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on day 19 of gestation in beef cows. Theriogenology. 2016;85(4):645-55. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.002. PMid:26525398.

DeJarnette JM, Saacke RG, Bame J, Vogler CJ. Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. J Anim Sci. 1992;70(2):484-91. http://dx.doi.org/10.2527/1992.702484x. PMid:1548211.

Demetrio DG, Santos RM, Demetrio CG, Vasconcelos JL. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. J Dairy Sci. 2007;90(11):5073-82. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0223. PMid:17954747.

Diskin MG, Niswender GD. Effect of progesterone supplementation on pregnancy and embryo survival in ewes. J Anim Sci. 1989;67(6):1559-63. http://dx.doi.org/10.2527/jas1989.6761559x. PMid:2768114.

Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. Development. 2000;127(19):4277-91. http://dx.doi.org/10.1242/dev.127.19.4277. PMid:10976058.

Erb RE, Garverick HA, Randel RD, Brown BL, Callahan CJ. Profiles of reproductive hormones associated with fertile and nonfertile inseminations of dairy cows. Theriogenology. 1976;5(5):227-42. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(76)90235-1. PMid:976584.

Fanjul LF, Ruiz de Galarreta CM, Hsueh AJ. Estrogen regulation of progestin biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells. Biol Reprod. 1984;30(4):903-12. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod30.4.903. PMid:6428475.

Farookhi R, Desjardins J. Luteinizing hormone receptor induction in dispersed granulosa cells requires estrogen. Mol Cell Endocrinol. 1986;47(1-2):13-24. http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207(86)90011-0. PMid:3017785.

Fields SD, Gebhart KL, Perry BL, Gonda MG, Wright CL, Bott RC, Perry GA. Influence of standing estrus before an injection of GnRH during a beef cattle fixed-time AI protocol on LH release, subsequent concentrations of progesterone, and steriodogenic enzyme expression. Domest Anim Endocrinol. 2012;42(1):11-9. http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.08.002. PMid:22019093.

Ford SP, Chenault JR. Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. J Reprod Fertil. 1981;62(2):555-62. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0620555. PMid:7252931.

Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. Biol Reprod. 2009;81(4):784-94. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.074336. PMid:19553605.

Forde N, Spencer TE, Bazer FW, Song G, Roche JF, Lonergan P. Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. Physiol Genomics. 2010;41(1):53-62. http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00162.2009. PMid:19996158.

Fortune JE, Quirk SM. Regulation of steroidogensis in bovine preovulatory follicles. J Anim Sci. 1988;66(Suppl 2):1-8.

Gauvreau D, Moisan V, Roy M, Fortier MA, Bilodeau JF. Expression of prostaglandin E synthases in the bovine oviduct. Theriogenology. 2010;73(1):103-11. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.006. PMid:19875162.

Geisert RD, Morgan GL, Short EC Jr, Zavy MT. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. Reprod Fertil Dev. 1992;4(3):301-5. http://dx.doi.org/10.1071/RD9920301. PMid:1438962.

Goldenberg RL, Bridson WE, Kohler PO. Estrogen stimulation of progesterone synthesis by porcine granulosa cells in culture. Biochem Biophys Res Commun. 1972;48(1):101-7. http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(72)90349-X. PMid:5041869.

Goltz JS, Gardner TK, Kanous KS, Lindemann CB. The interaction of pH and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on activation of motility in Triton X-100 extracted bull sperm. Biol Reprod. 1988;39(5):1129-36. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod39.5.1129. PMid:2851335.

Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, Spencer TE. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. Biol Reprod. 2001;64(6):1608-13. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1608. PMid:11369585.

Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. Theriogenology. 2001;56(9):1401-15. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00643-4. PMid:11768807.

Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. Theriogenology. 2014;81(1):152-69. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.010. PMid:24274419.

Hawk HW, Cooper BS. Improvement of sperm transport by the administration of estradiol to estrous ewes. J Anim Sci. 1975;41(5):1400-6. http://dx.doi.org/10.2527/jas1975.4151400x. PMid:1238386.

Hawk HW, Tanabe TY. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. J Anim Sci. 1986;63(2):551-60. http://dx.doi.org/10.2527/jas1986.632551x. PMid:3759689.

Hawk HW. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. J Dairy Sci. 1983;66(12):2645-60. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82138-9. PMid:6365994.

He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hattori MA. Up-regulation of Per1 expression by estradiol and progesterone in the rat uterus. J Endocrinol. 2007;194(3):511-9. http://dx.doi.org/10.1677/JOE-07-0172. PMid:17761890.

Henricks DM, Lamond DR, Hill JR, Dickey JF. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. J Anim Sci. 1971;33(2):450-4. http://dx.doi.org/10.2527/jas1971.332450x. PMid:5570075.

Hill JL, Walker SK, Brown GH, Nancarrow CD. The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the in vitro fertilization and development of ovine oocytes matured in vitro. Theriogenology. 1996;46(8):1379-88. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00317-2.

Hunter RH, Wilmut I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. Reprod Nutr Dev. 1984;24(5A):597-608. http://dx.doi.org/10.1051/rnd:19840508. PMid:6549076.

Ing NH, Roberts RM. The major progesterone-modulated proteins secreted into the sheep uterus are members of the serpin superfamily of serine protease inhibitors. J Biol Chem. 1989;264(6):3372-9. http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94076-7. PMid:2464597.

Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel OV, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hirasawa A, Shiojima S, Ikawa H, Suzuki Y, Tsujimoto G, Izaike Y, Todoroki J, Hashizume K. Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. Mol Reprod Dev. 2003;65(1):9-18. http://dx.doi.org/10.1002/mrd.10292. PMid:12658628.

Jinks EM, Smith MF, Atkins JA, Pohler KG, Perry GA, Macneil MD, Roberts AJ, Waterman RC, Alexander LJ, Geary TW. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. J Anim Sci. 2013;91(3):1176-85. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2012-5611. PMid:23296810.

Jones JM, Bavister BD. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. J Androl. 2000;21(5):616-24. PMid:10975407.

Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. Reproduction. 2006;132(2):217-32. http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.01076. PMid:16885531.

Kennaway DJ. The role of circadian rhythmicity in reproduction. Hum Reprod Update. 2005;11(1):91-101. http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmh054. PMid:15569698.

Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. Theriogenology. 1997;47(3):703-14. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00028-9. PMid:16728022.

Kessel B, Liu YX, Jia XC, Hsueh AJ. Autocrine role of estrogens in the augmentation of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. Biol Reprod. 1985;32(5):1038-50. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod32.5.1038. PMid:2990583.

King RS, Killian GJ. Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. Biol Reprod. 1994;51(3):34-42. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod51.3.34. PMid:7803605.

Koligian KB, Stormshak F. Progesterone inhibition of estrogen receptor replenishment in ovine endometrium. Biol Reprod. 1977;17(3):412-6. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod17.3.412. PMid:901893.

Larimore EL, Amundson OL, Bird SL, Funnell BJ, Kruse SG, Bridges GA, Perry GA. Influence of estrus at fixed-time artificial insemination on early embryonic development in beef cattle. J Anim Sci. 2015;93(6):2806-12. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2015-8892. PMid:26115268.

Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. Cell. 1997;91(2):197-208. http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80402-X. PMid:9346237.

Lohuis M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. Theriogenology. 1995;43(1):51-60. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(94)00016-N.

Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. Anim Reprod Sci. 2007;99(1-2):34-43. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.056. PMid:16777360.

Macmillan KL, Peterson AJ. A new intervagional progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrus. Anim Reprod Sci. 1993;33(1-4):1-25. http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(93)90104-Y.

Madsen CA, Perry GA, Mogck CL, Daly RF, MacNeil MD, Geary TW. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. Anim Reprod Sci. 2015;158:96-103. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.006. PMid:26022231.

Malayer JR, Hansen PJ, Buhi WC. Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. J Exp Zool. 1988;248(3):345-53. http://dx.doi.org/10.1002/jez.1402480313. PMid:3209983.

Mann GE, Lamming GE, Fisher PA. Progesterone control of embryonic interferon tau production during early pregnancy in the cow. J Reprod Fertil. 1998;21:37.

Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. Reproduction. 2001;121(1):175-80. http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1210175. PMid:11226041.

Martus NS, Verhage HG, Mavrogianis PA, Thibodeaux JK. Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. J Reprod Fertil. 1998;113(2):323-9. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.1130323. PMid:9861173.

McDonald LE, Nichols RE, McNutt SH. Study of corpus luteum ablation and progesterone replacement therapy during pregnancy in the cow. Am J Vet Res. 1952;13:446-51. PMid:12996761.

McNatty KP, Hunter WM, McNeilly AS, Sawers RS. Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human graafian follicles throughout the menstrual cycle. J Endocrinol. 1975;64(3):555-71. http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.0640555. PMid:1133546.

McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. J Clin Endocrinol Metab. 1979;49(6):851-60. http://dx.doi.org/10.1210/jcem-49-6-851. PMid:511976.

Merk FB, Botticelli CR, Albright JT. An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary; an electron microscope study. Endocrinology. 1972;90(4):992-1007. http://dx.doi.org/10.1210/endo-90-4-992. PMid:5011067.

Miller BG, Moore NW, Murphy L, Stone GM. Early pregnancy in the ewe: effects of oestradiol and progesterone on uterine metabolism and on embryo survival. Aust J Biol Sci. 1977;30(4):279-88. http://dx.doi.org/10.1071/BI9770279. PMid:603457.

Miller BG, Moore NW. Effect of progesterone and oestradiol on endometrial metabolism and embryo survival in the ovariectomized ewe. Theriogenology. 1976;6(6):636. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(76)90078-9. PMid:1029671.

Monteiro PL Jr, Nascimento AB, Pontes GC, Fernandes GO, Melo LF, Wiltbank MC, Sartori R. Progesterone supplementation after ovulation: effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. Theriogenology. 2015;84(7):1215-24. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.023. PMid:26255222.

Nadir S, Saacke RG, Bame J, Mullins J, Degelos S. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. J Anim Sci. 1993;71(1):199-204. http://dx.doi.org/10.2527/1993.711199x. PMid:8454543.

Nakamura TJ, Moriya T, Inoue S, Shimazoe T, Watanabe S, Ebihara S, Shinohara K. Estrogen differentially regulates expression of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. J Neurosci Res. 2005;82(5):622-30. http://dx.doi.org/10.1002/jnr.20677. PMid:16273538.

Nancarrow CD, Hill JL. Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. Cell Biol Int. 1994;18(12):1105-14. http://dx.doi.org/10.1006/cbir.1994.1037. PMid:7703951.

Nephew KP, Cardenas H, McClure KE, Ott TL, Bazer FW, Pope WF. Effects of administration of human chorionic gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. J Anim Sci. 1994;72(2):453-8. http://dx.doi.org/10.2527/1994.722453x. PMid:8157530.

Northrop EJ, Rich JJJ, Cushman RA, McNeel AK, Soares EM, Brooks K, Spencer TE, Perry GA. Effects of preovulatory estradiol on uterine environment and conceptus survival from fertilization to maternal recognition of pregnancy. Biol Reprod. 2018;99(3):629-38. http://dx.doi.org/10.1093/biolre/ioy086. PMid:29672673.

Ozturk S, Demir R. Particular functions of estrogen and progesterone in establishment of uterine receptivity and embryo implantation. Histol Histopathol. 2010;25(9):1215-28. PMid:20607663.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. Biol Reprod. 1989;41(4):683-99. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod41.4.683. PMid:2620077.

Parrott JA, Skinner MK. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. Endocrinology. 1998;139(1):228-35. http://dx.doi.org/10.1210/endo.139.1.5680. PMid:9421419.

Pereira MH, Rodrigues AD, Carvalho RJ, Wiltbank MC, Vasconcelos JL. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. J Dairy Sci. 2014;97(3):1454-64. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7287. PMid:24393173.

Perry GA, Perry BL. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. Domest Anim Endocrinol. 2008a;34(3):333-8. http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2007.09.003. PMid:17980539.

Perry GA, Perry BL. Effects of standing estrus and supplemental estradiol on changes in uterine pH during a fixed-time artificial insemination protocol. J Anim Sci. 2008b;86(11):2928-35. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1181. PMid:18641170.

Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(14):5268-73. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501700102. PMid:15795381.

Perry GA, Smith MF, Roberts AJ, MacNeil MD, Geary TW. Relationship between size of ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. J Anim Sci. 2007;85(3):684-9. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2006-519. PMid:17060416.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using $PGF_{2\alpha}$ and GnRH. Theriogenology. 1995;44(7):915-23. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(95)00279-H. PMid:16727787.

Quail LK, Cushman RA, Keel BN, Gonda MG, Perry GA. Preovulatory estradiol concentrations influence oviductal gene expression. In: Society for the Study of Reproduction Annual Meeting; 2021 Dec 15-18; St. Louis, United States. Reston: Society for the Study of Reproduction; 2021. p. MO2021.

Rawy M, Mido S, Ali HE-S, Derar D, Megahed G, Kitahara G, Osawa T. Effect of exogenous estradiol Benzoate on uterine blood flow in postpartum dairy cows. Anim Reprod Sci. 2018;192:136-45. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.001. PMid:29550273.

Reilly CM, Cannady WE, Mahesh VB, Stopper VS, De Sevilla LM, Mills TM. Duration of estrogen exposure prior to follicle-stimulating hormone stimulation is critical to granulosa cell growth and differentiation in rats. Biol Reprod. 1996;54(6):1336-42. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod54.6.1336. PMid:8724362.

Richardson BN, Hill SL, Stevenson JS, Djira GD, Perry GA. Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. Anim Reprod Sci. 2016;166:133-40. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.013. PMid:26805603.

Robinson NA, Leslie KE, Walton JS. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. J Dairy Sci. 1989;72(1):202-7. http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79098-6. PMid:2925946.

Ryan M, Mihm M, Roche JF. Effect of GnRH given before or after dominance on gonadotrophin response and fate of that follicle wave in postpartum dairy cows. J Reprod Fertil. 1998;21:61.

Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvao KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. Anim Reprod Sci. 2004;82-83:513-35. http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.015. PMid:15271477.

Sartori R, Gumen A, Guenther JN, Souza AH, Caraviello DZ, Wiltbank MC. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. Theriogenology. 2006;65(7):1311-21. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.055. PMid:16226307.

Seidel GE. Reproductive biotechnologies for profitable beef production. In: Beef Improvement Federation 27th Research Symposium and Annual Meeting; 1995 May-Jun 31-3; Sheridan, WY, United States. Beef Improvement Federation; 1995. p. 28.

Souza AH, Silva EP, Cunha AP, Gumen A, Ayres H, Brusveen DJ, Guenther JN, Wiltbank MC. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. Theriogenology. 2011;75(4):722-33. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.013. PMid:21196031.

Spencer TE, Bazer FW. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. J Anim Sci. 2004;82(E-Suppl):E4-13. PMid:15471813.

Spencer TE, Sandra O, Wolf E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. Reproduction. 2008;135(2):165-79. http://dx.doi.org/10.1530/REP-07-0327. PMid:18239047.

Stanke DF, Sikes JD, DeYoung DW, Tumbleson ME. Proteins and amino acids in bovine oviducal fluid. J Reprod Fertil. 1974;38(2):493-6. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0380493. PMid:4134580.

Sugiura T, Akiyoshi S, Inoue F, Yanagawa Y, Moriyoshi M, Tajima M, Katagiri S. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. J Reprod Dev. 2018;64(2):135-43. http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2017-139. PMid:29398684.

Sutton R, Nancarrow CD, Wallace AL. Oestrogen and seasonal effects on the production of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of sheep. J Reprod Fertil. 1986;77(2):645-53. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0770645. PMid:3735255.

Ulbrich SE, Frohlich T, Schulke K, Englberger E, Waldschmitt N, Arnold GJ, Reichenbach HD, Reichenbach M, Wolf E, Meyer HH, Bauersachs S. Evidence for estrogen-dependent uterine serpin (SERPINA14) expression during estrus in the bovine endometrial glandular epithelium and lumen. Biol Reprod. 2009;81(4):795-805. http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.108.075184. PMid:19494250.

Van Cleeff J, Drost M, Thatcher WW. Effects of postinsemination progesterone supplementation on fertility and subsequent estrous response on dairy heifers. Theriogenology. 1991;36(5):795-807. http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(91)90345-E. PMid:16727048.Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. Theriogenology. 2001;56(2):307-14. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00565-9. PMid:11480622.

Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. Theriogenology. 1999;52(6):1067-78. http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00195-8. PMid:10735113.

Walton JS, Halbert GW, Robinson NA, Leslie KE. Effects of progesterone and human chorionic gonadotrophin administration five days postinsemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. Can J Vet Res. 1990;54(3):305-8. PMid:2379109.

Wang XN, Greenwald GS. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. J Reprod Fertil. 1993;99(2):403-13. http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0990403. PMid:8107022.

Wegner CC, Killian GJ. In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. Mol Reprod Dev. 1991;29(1):77-84. http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080290112. PMid:2054184.

Welsh TH Jr, Zhuang L-Z, Hsueh AJW. Estrogen augmentation of gonadotropin-stimulated progestin biosynthesis in cultured rat granulosa cells. Endocrinology. 1983;112(6):1916-24. http://dx.doi.org/10.1210/endo-112-6-1916. PMid:6303748.

Wijayagunawardane MP, Miyamoto A, Taquahashi Y, Gabler C, Acosta TJ, Nishimura M, Killian G, Sato K. In vitro regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. J Endocrinol. 2001;168(1):117-30. http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.1680117. PMid:11139776.

Winuthayanon W, Bernhardt ML, Padilla-Banks E, Myers PH, Edin ML, Lih FB, Hewitt SC, Korach KS, Williams CJ. Oviductal estrogen receptor alpha signaling prevents protease-mediated embryo death. eLife. 2015;4:e10453. http://dx.doi.org/10.7554/eLife.10453. PMid:26623518.

Witkowska E. Reactivity of the epithelial cells of the bovine oviduct in vitro on the exogenic gonadotrophic and steroid hormones. Folia Histochem Cytochem. 1979;17(3):225-38.

Wong PY, Lee WM, Tsang AY. The effects of extracellular sodium on acid release and motility initiation in rat caudal epididymal spermatozoa in vitro. Exp Cell Res. 1981;131(1):97-104. http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(81)90410-9. PMid:7447992.

Zelinski MB, Noel P, Weber DW, Stormshak F. Characterization of cytoplasmic progesterone receptors in the bovine endometrium during proestrus and diestrus. J Anim Sci. 1982;55(2):376-83. http://dx.doi.org/10.2527/jas1982.552376x. PMid:6890550.

Zhuang L-Z, Adashi EY, Hsueh AJW. Direct enhancement of gonadotropin-stimulated ovarian estrogen biosynthesis by estrogen and clomiphene citrate. Endocrinology. 1982;110(6):2219-21. http://dx.doi.org/10.1210/endo-110-6-2219. PMid:6804221.

Author contributions

GAP: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing; JNK: Writing – original draft, Writing – review & editing; LKQ: Writing – original draft, Writing – review & editing.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

animals

MDPI

Review

Pre-Implantation Bovine Embryo Evaluation—From Optics to Omics and Beyond

R. A. Chanaka Rabel [1,2], Paula V. Marchioretto [1], Elizabeth A. Bangert [1], Kenneth Wilson [1], Derek J. Milner [1,2] and Matthew B. Wheeler [1,2,3,4,*]

[1] Department of Animal Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA; rrabel2@illinois.edu (R.A.C.R.); paulav@illinois.edu (P.V.M.); eb21@illinois.edu (E.A.B.); kwilson8@illinois.edu (K.W.); dmilner@illinois.edu (D.J.M.)
[2] Carl R. Woese Institute for Genomic Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA
[3] Department of Bioengineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA
[4] Department of Biomedical and Translational Sciences, Carle-Illinois College of Medicine, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA
* Correspondence: mbwheele@illinois.edu; Tel.: +1-217-333-2239

Simple Summary: With conventional breeding practices, even the best dairy/beef cows will likely produce no more than half-a-dozen calves in their lifetimes; a crime, would you not agree? In contrast, with embryo transfer technologies, a cow can pass her genetics to hundreds of calves through surrogate cows. As such, embryo transfer, particularly involving embryos produced by in vitro fertilization, also known as IVF, is being widely adopted. However, pregnancy rates from the transfer of IVF embryos remain unimpressive. Prior to transfer, embryos are evaluated under a microscope, and only high-quality embryos are transferred. Unfortunately, microscopy cannot accurately distinguish between high-quality and low-quality embryos. Many embryo evaluation methodologies have been tested to date to find a replacement for microscopy-based embryo evaluation, e.g., advanced microscopic systems and the evaluation of genetics and secreted proteins/molecules. The good news: many of them can accurately separate the wheat from the chaff. The bad news: many of them are expensive, kill embryos during evaluation, are too complicated, and/or are laborious and thus useless in the frontline, i.e., thousands of embryo production/transfer facilities. This article reviews the most common (and not so common) techniques that have been tested to date and provides insights about those that have the highest potential to replace microscopy-based embryo evaluation *in-field* applications.

check for updates

Citation: Rabel, R.A.C.; Marchioretto, P.V.; Bangert, E.A.; Wilson, K.; Milner, D.J.; Wheeler, M.B. Pre-Implantation Bovine Embryo Evaluation—From Optics to Omics and Beyond. *Animals* **2023**, *13*, 2102. https://doi.org/10.3390/ani13132102

Academic Editors: Ramanathan K. Kasimanickam and John P. Kastelic

Received: 22 May 2023
Revised: 16 June 2023
Accepted: 17 June 2023
Published: 24 June 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Approximately 80% of the ~1.5 million bovine embryos transferred in 2021 were in vitro produced. However, only ~27% of the transferred IVP embryos will result in live births. The ~73% pregnancy failures are partly due to transferring poor-quality embryos, a result of erroneous stereomicroscopy-based morphological evaluation, the current method of choice for pre-transfer embryo evaluation. Numerous microscopic (e.g., differential interference contrast, electron, fluorescent, time-lapse, and artificial-intelligence-based microscopy) and non-microscopic (e.g., genomics, transcriptomics, epigenomics, proteomics, metabolomics, and nuclear magnetic resonance) methodologies have been tested to find an embryo evaluation technique that is superior to morphologic evaluation. Many of these research tools can accurately determine embryo quality/viability; however, most are invasive, expensive, laborious, technically sophisticated, and/or time-consuming, making them futile in the context of *in-field* embryo evaluation. However accurate they may be, using complex methods, such as RNA sequencing, SNP chips, mass spectrometry, and multiphoton microscopy, at thousands of embryo production/collection facilities is impractical. Therefore, future research is warranted to innovate *field-friendly*, simple *benchtop tests* using findings already available, particularly from omics-based research methodologies. Time-lapse monitoring and artificial-intelligence-based automated image analysis also have the potential for accurate embryo evaluation; however, further research is warranted to innovate economically feasible options for *in-field* applications.

Keywords: bovine embryo evaluation; in vitro production; in vivo derived embryos; in vitro fertilization; bovine embryo grading; pre-implantation embryo quality; dairy cattle blastocyst morphological analysis; beef cattle embryo staging; bovine embryo transfer; assisted reproductive technologies

1. Introduction

The growing world population has created an ever-increasing demand for animal proteins. The beef and dairy industries play tremendous roles in this regard, annually contributing >72 million metric tons of meat (21% of global meat production) and >500 million metric tons of milk to the global market. *Reproduction* is a major driver of the bovine meat and milk *production* industries. As such, Assisted Reproductive Technologies (ARTs) such as in vitro embryo production (IVP), in vivo derived embryo production (IVD), and embryo transfer (ET) have gained enormous importance in the beef and dairy cattle industries [1]. As illustrated in Figure 1, the annual production of transferrable bovine embryos has nearly doubled within the 12-year period from 2009 to 2021. What is even more striking is the shift of embryo production from IVD to IVP, with embryo production by IVP quadrupling over the same period. In 2021, over 1.5 million transferrable IVP embryos were produced (Figure 1), of which nearly 80% (~1.2 million) were transferred [2]. Parallel to this rapid expansion of IVP, the interest from the scientific community and, in turn, research publications have also risen many-fold over the last few decades (Figure 2A–C).

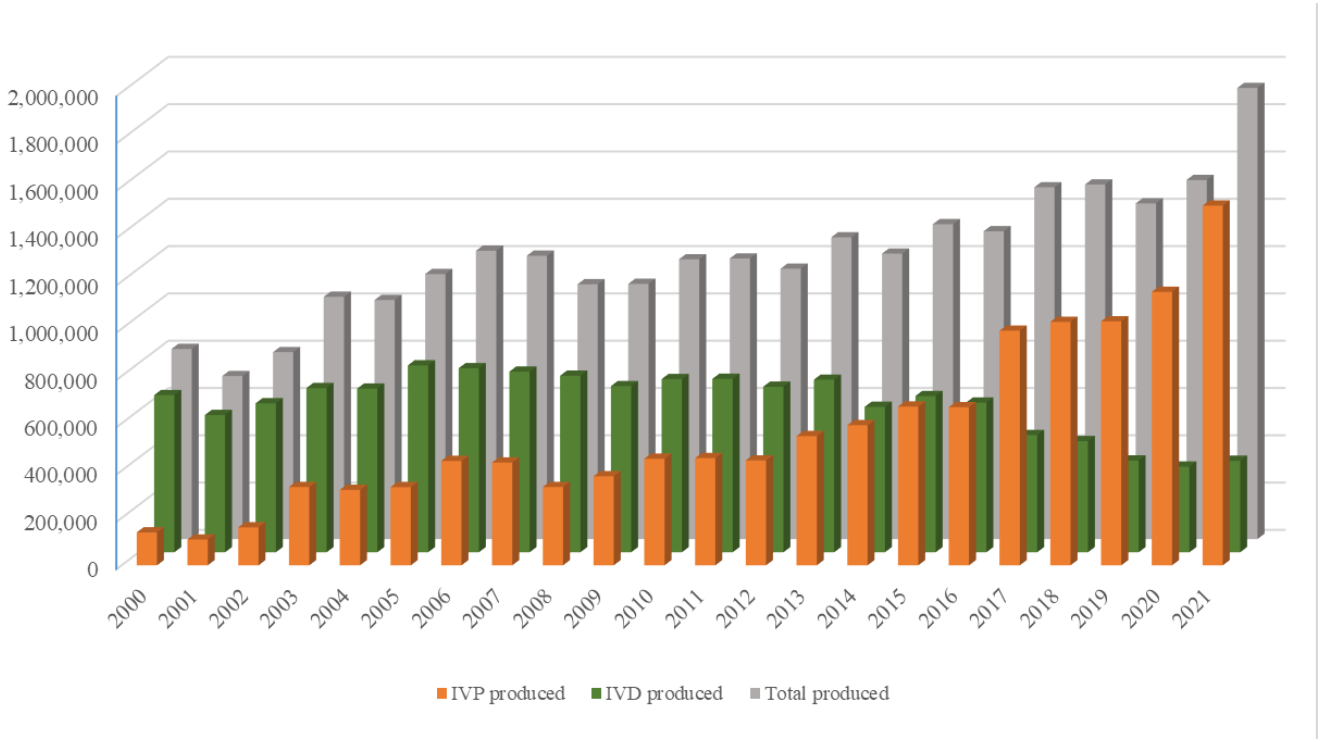
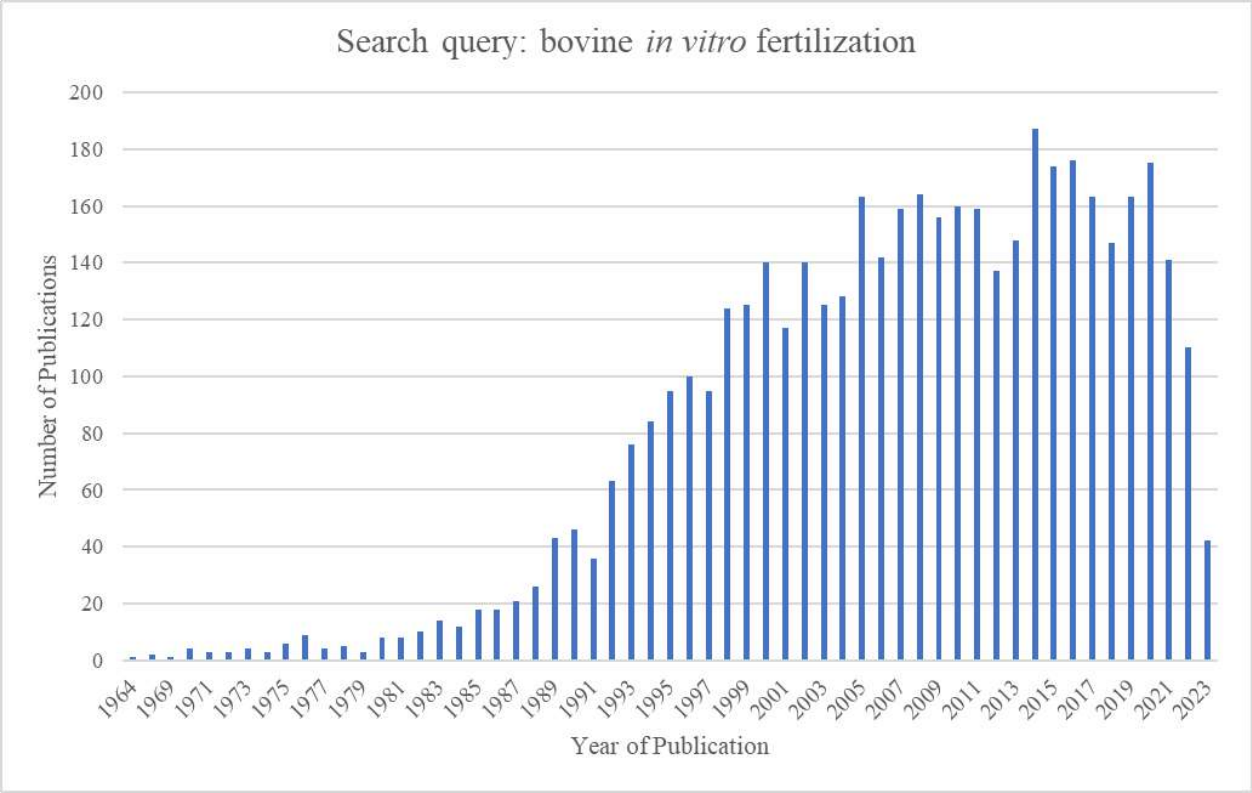
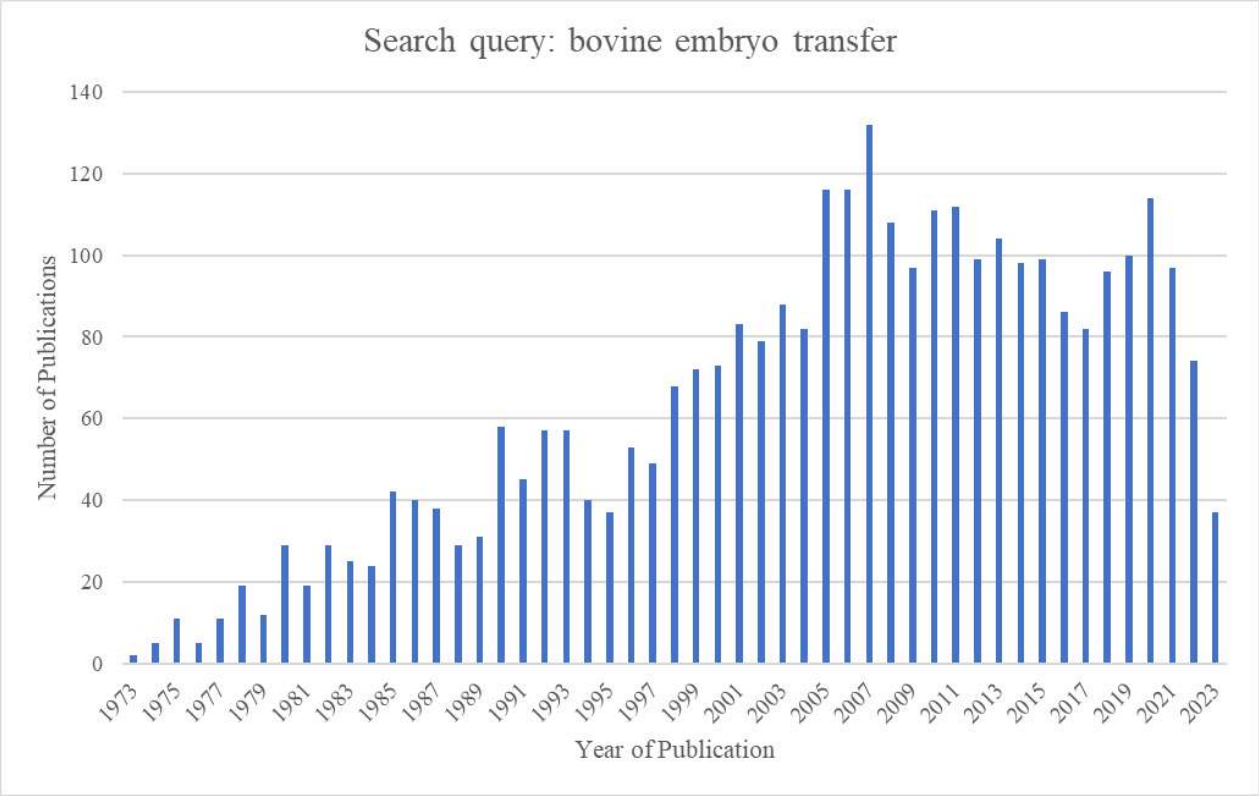


Figure 1. Annual production of IVP (orange bars), IVD (green bars), and total number (gray bars) of bovine embryos. Compiled from 2001–2022 annual Data Retrieval Committee Reports of the International Embryo Transfer Society.



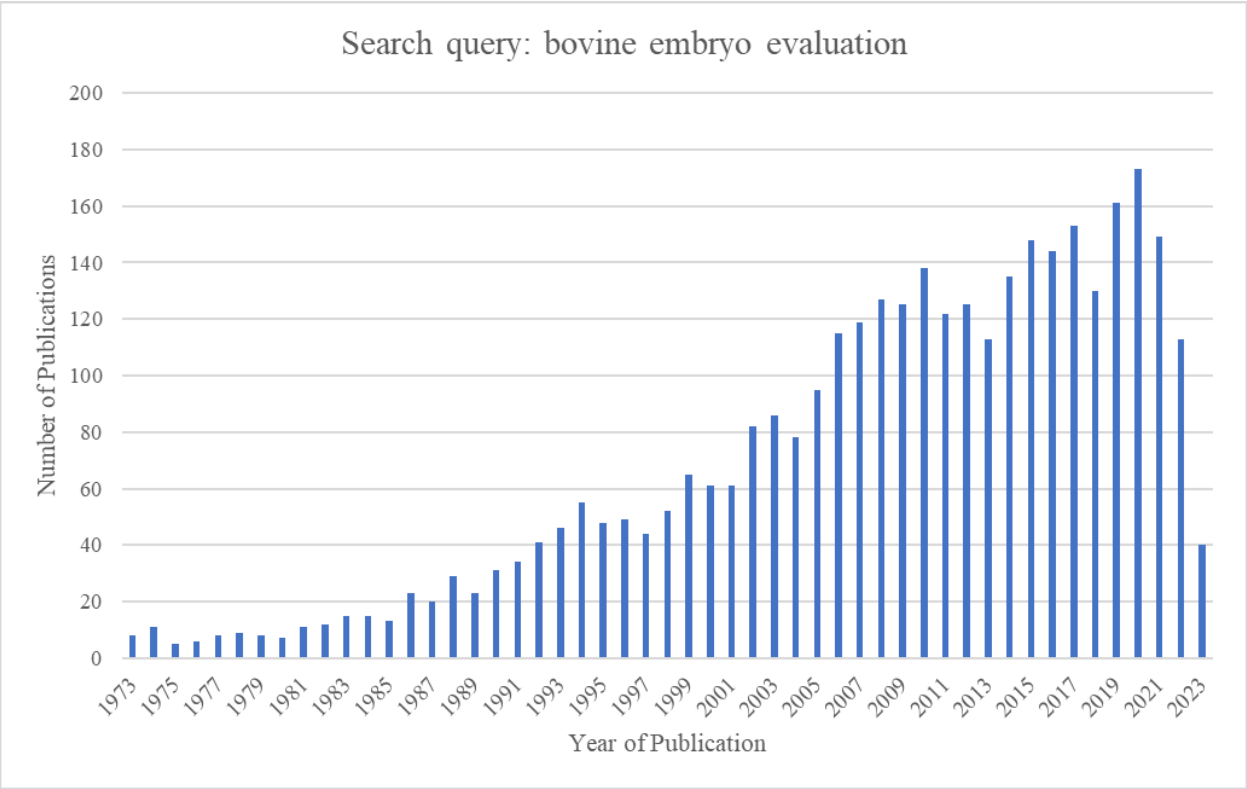
(**A**)



(**B**)

Figure 2. *Cont.*

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir



(**C**)

Figure 2. Number of publications identified in Pubmed.gov by year for the search queries (**A**) "bovine in vitro fertilization" (1964–2023), (**B**) "bovine embryo transfer" (1973–2023), and (**C**) "bovine embryo evaluation" (1973–2023).

It is commonly accepted that the developmental competence, quality, and cryo-survival of IVP embryos are overall lower than those of IVD embryos. Further, pregnancy rates (PRs) resulting from the transfer of IVP embryos are lower than those from the transfer of quality- and stage-matched IVD embryos reviewed by [3–6]. For both IVP and IVD embryos, it is well established that the transfer of higher-quality blastocysts results in higher PRs compared to the transfer of lower-quality blastocysts [7–9]. Therefore, if embryos can be accurately evaluated and the high-quality ones could be selected for ET, the commercial value of selected embryos would increase, with a subsequent decrease in the number of recipients and an overall improvement in the efficiency of ET [10]. Therefore, one of the most important factors associated with the successful application of ARTs is *embryo evaluation* prior to freezing or transfer to recipients [11,12]. At present, the most widely used method for determining embryo quality is morphological evaluation using stereomicroscopy [6]. However, it is considered to have poor accuracy and poor reproducibility and to be biased by the subjectivity of the evaluator, i.e., intra- and inter-observer variability [1,5].

Together, the current trend favoring IVP and the limitations of current morphology-based embryo evaluation methods demand the in-depth study of pre-implantation bovine embryos (i) to better understand the physiology of embryo development and (ii) to discover embryo viability/quality markers that can be used for the accurate prediction of post-transfer embryo survival and the pregnancy outcome. As a result, a wide variety of methodologies, ranging from optics to omics-based methodologies to gene editing and everything else in between, have been used to evaluate and analyze bovine embryos.

The aim of this review is to provide an overview of the various embryo evaluation methodologies used not only during the post-IVP era but also starting from 1931, the first available record of the microscopic anatomy of pre-implantation bovine embryos from Hendrys et al. [13]. In this review, we also provide insights about embryo evaluation

MAJALAH EDISI 12 TAHUN 2023 DESEMBER 2023 Halaman 280

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

tion methodologies that have the highest potential for adoption at the *ground level* as a replacement for conventional stereomicroscopy-based morphological embryo evaluation.

We conclude that sophisticated embryo evaluation tools such as omics-based methodologies are unfit to be *directly* used for *in-field* embryo evaluation. However, findings from these methodologies can be applied *indirectly* for *in-field* embryo evaluation if *field-friendly*, simple, and affordable *benchtop tests* are developed. Further, findings from time-lapse monitoring (TLM) and artificial-intelligence-based automated image analysis look very promising. With further improvements and the innovation of economically affordable options, they may be directly used for *in-field* applications.

2. Evaluation of Pre-Implantation Bovine Embryos

Embryo evaluation is two-fold and is typically performed prior to cryopreservation. They are evaluated for the *developmental stage (grade)* and *quality*. Currently, only embryos satisfying minimum criteria in both these facets are selected for freezing or direct transfer.

2.1. Evaluation for Embryo Quality

The microscopic anatomy of the bovine embryo was first described in 1931 for a *two-celled ovum* [13], and subsequent stages up to the blastocyst stage were characterized in 1946 [14]. However, it was not until the mid-1970s, when bovine embryo transfer, carried out at an experimental scale thus far, was transformed into a commercial-scale venture [15], that the first attempts at embryo evaluation were made [16]. The authors rated 8–12-celled embryos and morulae on a scale of 1 to 5 (Table 1) "*on the basis of compactness, symmetry and density of the blastomeres*". They observed that pregnancy rates resulting from the transfer of morulae were higher than those resulting from the transfer of 8–12-celled embryos, and that the highest pregnancy rates were obtained by transferring morulae of the highest quality, i.e., a rating of 5. However, the authors admitted that *"This rating, by its very nature, was subjective and hence any rigid analysis of the results would not be truly scientific"*.

A set of relatively less subjective criteria were used in a 1978 report that categorized embryos into four classes, namely, excellent, good, fair, and poor ([17]; Table 1). They observed that, upon transfer, embryos categorized as "excellent" and "good" gave the highest pregnancy rates (PRs), while those categorized as "poor" gave the lowest PRs. A 1981 study adopted a classification system where embryos were given ratings of 2, 3, or 4 ([18]; Table 1). Similar to previous studies, embryos with a higher rating gave higher pregnancy rates compared to embryos with lower ratings. A 1983 study ([7]; Table 1) used the same "excellent", "good", "fair", and "poor" classification system used by Elsden, Nelson, 1978 [17], but with slightly modified defining criteria. Consistent with previous studies, excellent and good embryos gave the best pregnancy rates. They went on to conclude that embryo quality, but not the stage of development (16-cell through hatched blastocysts), is the most accurate predictor of an embryo's competency to establish a pregnancy. This finding contradicted the previous observations of Shea, Hines, 1976 [16], and Newcomb and Rowson, 1975 [19], where the authors observed higher PRs when transferring morulae compared to 8–12-celled embryos and higher PRs when transferring 5–7-day-old embryos compared to <5-day-old embryos, respectively. These observations highlight the need to devise strategies for embryo grading, as very early stage embryos with as few as 4–8 blastomeres as well as very late stage embryos as late as hatched blastocysts were being transferred during this period of time.

In addition to the compactness, symmetry, and density that were considered by Shea, Hines, 1976 [16], for embryo evaluation, the later classifications also considered criteria such as the color and shape of blastomeres, signs of degeneration such as vesiculation, the extrusion of blastomeres from the main cell mass, the retardation of embryos, and the integrity of the zona pellucida.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 1. Evaluation of bovine embryo quality based on morphological characteristics.

Source	Criteria
[16]	"5: excellent appearing 4 3: average appearing 2 1: very poor appearing" rated "*on the basis of compactness, symmetry and density of the blastomeres*"
[17]	"Excellent—judged to be at the normal stage of development at the time of examination; embryos were symmetrical, and blastomeres were polygonal in shape forming a tight mass at the morula stage. Good—similar to excellent embryos but were asymmetrical, contained blastomeres excluded from the main morula mass, or were slightly retarded relative to other embryos recovered from the same donor Fair—embryos were retarded 1 to 2 days in development, had spherical rather than polygonal blastomeres at the morula stage, contained blastomeres of varying sizes, had signs of degeneration such as large vesicles in the cells, and/or were darker or lighter than normal Poor—embryos were retarded 2 or more days in development, had indistinct cell membranes, and/or had more severe faults than the fair embryos"
[18]	"4—embryo is above average in appearance (perfectly symmetrical, even granulation, no deformations in the zona pellucida, no blastomeres extruded) 3—embryo is average in appearance 2—embryo is below average in appearance (uneven blastomere size, extensive blastomere extrusion, evidence of membrane rupture)"
[7]	"Excellent—an ideal embryo, spherical, symmetrical with cells of uniform size, color and texture Good—trivial imperfections such as a few extruded blastomeres, irregular shape, few vesicles Fair—definite but not severe problems, presence of extruded blastomeres, vesiculation, few degenerated cells Poor—severe problems, numerous extruded blastomeres, degenerated cells, cells of varying sizes, large numerous vesicles but a viable-appearing embryo mass"
[20]	"Code 1: Excellent or good Code 2: Fair Code 3: Poor Code 4: Degenerated"

2.2. Evaluation for Embryo Staging/Grading

None of the embryo evaluation systems shown in Table 1 recognized the developmental stages of embryos; i.e., an embryo categorized as "excellent" could be a morula, early blastocyst, expanded blastocyst, etc. Even though a coding system that identifies embryo developmental stages had already been published ([21]; Table 2), it was not incorporated into embryo evaluation criteria until the International Embryo Transfer Society (IETS) introduced a two-digit coding system that would uniformly and systematically describe embryos by their stage of development as well as their quality [20] (Supplementary Figures S1–S19). The first digit identified the stage of embryonic development, ranging from 1 (an unfertilized oocyte) to 9 (an expanding hatched blastocyst; Table 2), while the second digit identified embryo quality (based on morphological characteristics), ranging from 1 (excellent/good) to 4 (degenerated; Table 2). For example, an embryo with a 7–1 coding would refer to an expanded blastocyst of excellent/good quality. This two-digit coding system, introduced in 1998, remains the gold standard for embryo evaluation and grading within the bovine embryo production and transfer industry.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 2. Coding based on developmental stages of bovine embryos.

Source	Code	Criterion/Definition
[21]	1	2-cell embryo
	2	4-cell embryo
	3	8-cell embryo
	4	Morula (16–32 cells)
	5	Morula (32–64 cells)
	6	Blastocyst
	7	Hatched blastocyst
[20]	1	Unfertilized
	2	2- to 16-cell embryo
	3	Early morula
	4	Morula
	5	Early blastocyst
	6	Blastocyst
	7	Expanded blastocyst
	8	Hatching blastocyst
	9	Hatched blastocyst

3. Embryo Evaluation/Analysis—Tools of the Trade

According to the currently accepted norms of bovine embryo evaluation [20], the ideal unhatched bovine embryo should have the following characteristics: the embryo should be compact, spherical, and 150 to 190 µm in diameter (including the 12 to 15 µm thickness of the zona pellucida); blastomeres should be uniform in size, color, and texture; the blastomere cytoplasm should be free of granules and vesicles; perivitelline spaces should be clear and free of cellular debris; and the zona pellucida should be uniform and free of cracks and surface debris (Supplementary Figures S1–S19).

Embryo evaluation is typically performed using a stereomicroscope at 50 to 100× magnification. Embryos are held in a holding dish with holding media and evaluated by rolling it so that the entire embryo and zona pellucida can be evaluated from different angles. However, this type of morphological assessment is considered biased by the subjectivity of the evaluator, i.e., intra- and inter-observer variability [5], and therefore not considered 100% reliable and trustworthy [22,23]. Supporting this notion, differences in ultrastructure [24] and the transcriptome [25] have been demonstrated in morphologically similar, stage- and quality-matched bovine blastocysts. As mentioned earlier, a wide variety of tools have been used to study embryos to understand pre-implantation development and to search for that perfect embryo evaluation method. The following sections address these tools and techniques in detail.

3.1. Microscopic Analyses

3.1.1. Light Microscopy

Light microscopy has been one of the most fundamental and widely used tools in biology for nearly two centuries. It is ubiquitously used to analyze both fixed and living cells and is widely regarded as the least invasive method to obtain biological information from living cells [26]. This feature makes it particularly useful, to the point of being absolutely required, for analyzing embryos in research and commercial enterprises that produce bovine embryos for breeding. As stated previously, the standard method for evaluating embryo quality utilizes light microscopy: in typical cases, the direct observation of embryo morphology under a stereomicroscope. However, magnification is limited when using stereomicroscopes, and morphological details can be more readily discerned by observation with compound microscopes utilizing higher magnifications. Indeed, a study conducted in 2002 comparing embryo quality, as evaluated by observation under a stereomicroscope, standard compound microscope, and electron microscope, found that observation under a stereomicroscope leads to the overestimation of embryo quality, as signs of embryonic degeneration are more readily apparent at the higher magnifications

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

available with compound microscopes or the electron microscope [27]. Unfortunately, specimen preparation requirements for observation at higher magnifications under a compound microscope or electron microscope are not compatible with embryo viability.

3.1.2. Differential Interference Contrast (DIC) Microscopy

For most living cells observed under standard light microscopy, the contrast is poor, and they appear almost transparent. It is difficult to discern cellular structures, no matter the ability of the magnifying and resolving power of the lenses in use, unless the cells are fixed and stained with chemical agents that provide contrast. These procedures almost invariably kill living samples. Because of this, microscopists have endeavored to develop optical techniques that provide contrast to cellular structure without requiring the use of fixatives and stains, thus allowing better visualization of living cells. These techniques are commonly used in biological microscopy today and include phase-contrast microscopy, darkfield microscopy, polarized light microscopy, Hoffman modulation contrast, and differential interference contrast (DIC) microscopy.

Developed by Georges Nomarski in the early 1950s [28], DIC utilizes polarized light that is passed through a prism, through the specimen, and then through another prism and depolarized to produce interference that results in one side of the structure that the light has passed through appearing bright and the other side appearing dark. Overall, imaging cells using this technique produces a shadowing effect that gives cells a 3D-relief-like appearance [29].

DIC microscopy is a good option for imaging embryos and live cells. DIC imaging of embryos has been used to create the qualitative scoring systems used today for bovine embryo grading/staging (personal communication, Prof. Matthew Wheeler, UIUC). DIC has been used to study bovine embryos, particularly to study pre-implantation-stage embryo development, to study subcellular components such as lipid droplets and pronuclei, to study the effects on different culture media, and to visualize microinjection procedures (Table 3). As a standalone procedure, DIC use for the analysis of embryos is declining, but its presence continues in combination with other techniques and more complex imaging systems.

Table 3. Applications of DIC microscopy in bovine embryo evaluation and analysis.

Applications of DIC in Bovine Embryo Analysis	Source
Visualization of pronuclei	[30]
Evaluation of embryos between days 4 and 8 of culture	[31]
Evaluation of cleavage	[32]
Visualization of lipid droplets	[33]
Comparison of 8-cell-stage embryos in different culture media and visualization of cytoplasmic lipid droplets	[34]
Visualization of DNA microinjection into the male pronucleus	[35,36]
Observation of the development of individual embryos	[37]
Observation of cytoplasmic lipid droplets	[38,39]

3.1.3. Electron Microscopy

The maximum magnification that can be achieved with standard light microscopy is generally no more than 1000×. In contrast, electron microscopy allows magnifications up to around 160,000×. This allows cellular ultrastructure to be clearly visualized. In terms of resolution, while standard light microscopy can resolve structures at about 250 nm in size, the resolving power of electron microscopes provides almost a 1000-fold increase in resolution, getting down to around the 0.2 nm range [40].

The very first study that examined the ultrastructure of pre-implantation bovine embryos was carried out in 1978 [41]. The authors specifically used scanning electron microscopy to study hatching blastocysts that were recovered *unhatched* from cows 7–10 days after estrus and then allowed to hatch during in vitro culture. Many studies have been

MAJALAH EDISI 12 TAHUN 2023, DESEMBER 2023 Halaman 284

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

carried out since then to study various aspects of pre-implantation bovine embryos, including organelle structures in blastomeres [42,43], the nucleologenesis of blastomeres [44–47], the embryonic cell cycle [48,49], events associated with fertilization (in vitro) and zygote formation [50], the effects of vitrification [51], the effects of different culture media on IVP blastocysts [52–54], and the effects of cryopreservation on IVD and IVP blastocysts [55], and to compare IVD and IVP embryos [43,56,57].

A study that compared the accuracy of bovine embryo grading using stereomicroscopy, light microscopy, and transmission electron microscopy (TEM) found that TEM has a better accuracy in identifying "good"- and "fair"-quality blastocysts compared to the other two types [24]. However, this finding has minimal value from a practical application point of view in the dairy industry because fixing embryos for TEM makes them unviable. Therefore, although TEM can be used as a research tool to learn about pre-implantation embryo development, it has little value for routine IVF procedures in the dairy industry [58].

3.1.4. Fluorescence Microscopy

Another modification of light microscopy that is widely used today in biological research is fluorescence microscopy [59]. Fluorescence is the emission of light by a substance that has absorbed light or other electromagnetic radiation. This form of microscopy takes advantage of the ability of different compounds, referred to as fluorophores, to emit light with a monochromatic wavelength when they absorb light with a higher-energy wavelength. By coupling fluorophores with molecular probes that can recognize different proteins or other types of biological molecules, researchers can visualize and quantify the presence of different biological molecules of interest within cells, and they can observe the location and distribution of different molecules within cells, embryos, and tissues in order to gain insights on molecular and cellular functions. As with standard light microscopy, fluorescence microscopy is limited in resolving power to about 200 nm, and techniques for labeling cells with fluorophore-coupled probes are not usually compatible with cell viability. However, there are some techniques available for the fluorescent imaging of living cells and embryos [60].

Fluorescent microscopy has been used to study various aspects of pre-implantation bovine embryo development for simple tasks, such as counting blastomere numbers using DAPI or Hoechst nuclear staining [61,62] or detecting de novo DNA synthesis [63], as well as for more complicated procedures, such as fluorescent in situ hybridization (FISH) for detecting chromosomal abnormalities [63] or the immunodetection of the epigenetic markers H3K9ac and H3K9m2 [62] and the transcription factor POU5F1 [64].

The fluorescent microscopic techniques outlined above produce flat, two-dimensional (2D) images of embryos. In contrast, confocal microscopy and multiphoton laser scanning microscopy (MPLSM) can be used to produce 3D images of embryos, which can be more informative than 2D images. As with standard fluorescence microscopy, confocal microscopy and MPLSM are typically used in conjunction with molecule-specific fluorescence labeling, which allows the identification and study of not only subcellular organelles and components (e.g., lipid droplets and mitochondria) but also the intraembryonic and intracellular localization of proteins/gene products (e.g., transcription factors and lineage-specific markers). Additionally, a relatively new non-fluorescent microscopic technique, Gradient Light Interference Microscopy (GLIM), allows the production of three-dimensional (3D) images. The following sections discuss how these 3D microscopic techniques have been used in the study of pre-implantation bovine embryos.

3.1.5. Confocal Microscopy

The widespread use of fluorescent confocal microscopy on cells and tissues started in the late 1980s [65,66] because of its great applicability to quantitative analysis [67]. In conventional fluorescence microscopy, the entire sample is exposed to the excitation light source, and the entire sample emits fluorescence. When observed under the microscope and images are acquired, some out-of-focus fluorescent signals interfere with the in-focus light

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Additionally, the exposure of whole live cells and embryos to this light source can cause phototoxicity, resulting in decreased cell viability. Through the use of optical sectioning technology, the confocal microscope allows the exposure and gathering of the fluorescent signal from a relatively narrow focal plane of the sample. By gathering images of focal planes throughout the sample (commonly referred to as z-stacks), three-dimensional images can be created. This can be applied to either fixed or live embryos [67,68]. There is still some risk of phototoxicity due to the power of the excitation source and the length of the scanning time, but it is possible to minimize this challenge by properly selecting the microscope, settings, and sample processing method [68]. Additionally, bovine embryos are able to maintain viability by successfully overcoming certain levels of phototoxicity [69]. Of the different confocal microscopic optical sectioning techniques available, the spinning-disk confocal system is considered the preferred technique for live imaging [68,70].

Confocal laser scanning has been widely applied to fixed and live samples to visualize specific cellular structures using fluorescent labeling or a label-free approach [68]. In pre-implantation bovine embryos, confocal microscopy has been used for a variety of applications, as summarized in Table 4.

Table 4. Applications of confocal microscopy in bovine embryo evaluation and analysis.

Applications of Confocal Microscopy in Bovine Embryo Analysis	Source
Using targeted fluorescent labeling	
TUNEL labeling of apoptotic nuclei	[37,71,72]
Intracellular localization of nucleolar proteins	[44]
Characterization of the zona pellucida	[73]
Intracellular localization of Nalp5/Mater	[74]
Study of DNA methylation patterns	[75]
Intracellular localization of IGF1R, IGF2, and IGF2R	[76]
Intracellular localization of pluripotency and lineage-specific markers NANOG, OCT4, CDX2, and GATA6	[77–80]
Non-invasive long-term live-cell imaging of IVP embryos	[81]
Characterization of mitochondrial activity and distribution of lipid droplets	[82]
Using label-free imaging	
Detection of autofluorescence of FAD and NAD(P)H (to assess metabolic status)	[83]

3.1.6. Multiphoton Laser Scanning Microscopy (MPLSM)

Even though confocal microscopy has been used successfully for imaging the subcellular components, transcription factors, lineage-specific markers, and metabolites of bovine embryos, it can still be phototoxic to live cells/embryos and potentially compromise their viability. In contrast, MPLSM can be used for imaging fluorescent markers in relatively thick specimens, such as mammalian embryos, without compromising their viability [84]. Further, MPLSM is considered superior to confocal microscopy for scanning thick specimens, such as mammalian embryos, that exhibit significant light-scattering properties. These beneficial characteristics of MPLSM are primarily due to multiphoton systems using infrared lasers as their excitation source. Infrared light is lower in energy and scatters much less compared to light with excitation wavelengths used in confocal or standard fluorescence microscopy [85]. MPLSM has been used to image cellular organelles such as mitochondria in bovine blastomeres [85]; however, its use for studying pre-implantation bovine embryos has been very limited, possibly due to the high expenditure on equipment and the need for technical expertise [69].

Our group has begun preliminary studies using simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic (SLAM) microscopy [86], which is a single-excitation source nonlinear imaging platform to analyze the metabolic pathways in bovine embryos (Tu and Wheeler, 2023, personal communication).

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

3.1.7. Gradient Light Interference Microscopy (GLIM)

There are two major deficiencies in many of the microscopic techniques discussed earlier. First, the imaging of optically dense specimens such as embryos with conventional microscopy results in multiple scattering that scrambles the optical field, giving rise to low-contrast micrographs that often lack cellular-level detail [11,87]. Secondly, microscopic techniques such as TEM and fluorescent microscopy cannot be used to image live embryos.

GLIM can be used to overcome both of the above deficiencies. On the one hand, it can be used for the real-time imaging of *thick* embryos, overcoming multiple scattering. On the other hand, as a label-free method, GLIM can be used to image embryos without affecting their viability, thus enabling the technology to be used in the evaluation of in vitro produced bovine embryos prior to freezing and/or transfer [88]. Additionally, GLIM is a relatively rapid technique in that it takes ~1 min for image acquisition and >5 min for the virtual reconstruction of the image. GLIM can also be used to track and follow lipid droplet movement, which could be a possible marker of embryo quality [29], as lipid movement has been linked to protein and lipid exchange between cellular compartments in embryos of certain other species [89].

GLIM is a type of quantitative phase imaging (QPI) that combines DIC microscopy with low-coherence interferometry and holography. It is considered superior to other QPI methods, such as Spatial Light Interference Microscopy (SLIM), for imaging optically thick samples such as embryos. GLIM can be used to obtain high-contrast three-dimensional, white-light, tomographic imaging of both thin samples, such as single cells, and relatively thick specimens, such as bovine embryos. GLIM has been used to obtain 3D stacks of bovine embryos at different development stages over several days using time-resolved tomography. Using GLIM tomography, researchers were able to study individual blastomeres, their plasma membranes, gaps between plasma membranes of different blastomeres, lipid droplets in blastomeres, etc. [58]. Considering these favorable properties, GLIM has the potential to become a valuable tool for the evaluation of in vitro produced bovine embryos.

3.1.8. Time-Lapse Monitoring (TLM)

The previously described microscopic techniques allow the spatial evaluation of embryos. However, embryo development is a dynamic process, and critical stages of development may go unnoticed with such traditional, one-time morphologic assessments [90]. In contrast to these one-time morphological evaluations, time-lapse monitoring (TLM) allows embryos to be evaluated temporally as well. TLM facilitates the study of morphokinetics, allowing the correlation of early events with subsequent development and even pregnancy outcomes. Embryos could be inspected multiple times with conventional microscopy too; however, such frequent evaluations can be detrimental to embryos owing to the frequent handling and exposure to changes in temperature and gas concentrations. In contrast, TLM allows the frequent and non-invasive imaging of developing embryos while maintaining *incubator conditions* [91].

The first reports on the TLM of bovine embryos were published in the early 1980s [92,93]. Morulae collected from uterine horns were allowed to grow and hatch in vitro while being continuously monitored. These authors observed that pulsatile expansion and contraction was *not a necessary condition* for the hatching of the bovine blastocyst, an observation that could not have been made with conventional *one-time microscopy*. Since then, TLM has been used extensively to study pre-implantation bovine embryo morphokinetics, as summarized in Table 5. Some of these studies observed that morphokinetic indicators (MKIs), such as the timing of the first cleavage, the number of blastomeres at the first cleavage, and the number of blastomeres at the onset of the lag phase, could be used as markers for predicting blastocyst quality and the pregnancy outcome [94,95]. Some have even proposed MKIs as a superior substitute to the IETS' morphology-based grading system [81].

TLM studies from the 1980s–2000s mostly used a cinematographic chamber placed on an inverted microscope. However, with the advancements in technology, high-resolution imaging equipment has been incorporated into fully functional incubators, enabling embryo-

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

safe recording, i.e., TLM (e.g., Primo Vision, Vitrolife, Goteborg, Sweden, and Real-Time Cultured Cell Monitoring System with Multiple-Point Imaging Capture (CCM-MULTI), Astec, Fukuoka, Japan). These systems have been successfully used to study pre-implantation bovine embryo development. Taking TLM a step further, several recent studies have used confocal laser microscopy for time-lapse live-cell imaging [81] to shed light on aspects of bovine embryo development in both temporal and spatial dimensions. The advantages of four-dimensional (4D) imaging over other microscopic techniques are numerous and have been reviewed elsewhere [96].

Table 5. Applications of time-lapse monitoring in bovine embryo evaluation and analysis.

Applications of TLM in Bovine Embryo Analysis	Source
To compare cleavage intervals of healthy embryos and degenerate embryos	[97]
To study development kinetics of embryos derived from calf oocytes	[98]
To study the effects of activin A and follistatin on developmental kinetics	[99]
To study effects of glucose on developmental kinetics of male and female embryos	[100]
To compare developmental kinetics of IVD and IVP embryos	[101]
To study dynamics of the 4th cell cycle coincident with EGA	[102]
To compare kinetics of initial cleavage patterns in viable and non-viable embryos	[103]
To study embryo development in well-of-the-well (WOW) systems	[104]
To identify morphokinetics predictive of blastocyst quality and pregnancy outcome	[94]
To study effects of abnormal cleavage patterns on morphokinetics and growth potential	[105]
To study development kinetics of IVP embryos fertilized with sex-sorted semen	[106]
To study pronuclear morphokinetics	[107]
To study effects of first zygotic cleavage dysmorphisms on the metabolomic profile	[108]
To correlate embryo morphokinetics with their transcriptomic profiles	[109]
To study morphokinetics of embryos derived from vitrified bovine oocytes	[90]

In summary, every microscopic technique that has been used to study bovine embryos to date has its unique pros and cons. Conventional light microscopic methods are simple to use, relatively inexpensive, and non-invasive and therefore can be used without affecting embryo viability, even in locations with limited infrastructural facilities. However, morphological evaluation by conventional light microscopy may be limited by its magnification, resolution, and contrast. On the other hand, technologically advanced microscopic methods such as TEM and fluorescent microscopy are not compatible with maintaining the viability of embryos. Therefore, even though these techniques can be used to study embryo physiology, even at the molecular level, they are invasive methods that have no real-world applications in evaluating live embryos prior to freezing or transfer. GLIM can overcome many of the limitations discussed above for other microscopic techniques. However, it involves the use of highly sophisticated and expensive equipment, as this technology is still relatively new. Similarly, the imaging equipment used in TLM is also sophisticated and expensive. Therefore, it is unlikely that these techniques will be adopted by the dairy and beef industries at the national and global scales at the current time.

3.2. Non-Microscopic Analyses

3.2.1. Pre-Implantation Genetic Diagnosis (PGD)

The term Pre-implantation Genetic Diagnosis (PGD) was coined in the late 1980s [110] to describe a procedure where a biopsy of embryonic cells is tested for *diagnosing* a genetic trait. However, similar procedures took place as early as 1968 when 5–6-day-old pre-implantation-stage rabbit blastocysts were sexed by the microscopic identification of *sex chromatin* in biopsied trophoblast cells [111]. In fact, until the early 1990s, most genetic *diagnoses* of pre-implantation embryos were aimed at sex determination because transferring a known female embryo would lead to numerous benefits to livestock industries [112]. This was especially important in the *pre-sexed semen era*, where embryo sexing was the only viable option if IVD or IVP embryos were to be sexed before being used in various livestock embryo transfer programs.

Initial studies on embryo sexing of pre-implantation bovine embryos involved in situ hybridization with DNA probes specific to DNA [113,114]. However, the methodology

MAJALAH EDISI 12 TAHUN 2023, DESEMBER 2023 Halaman 288

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

the polymerase chain reaction (PCR; [115]), it became the method of choice for sex determination and other pre-implantation genetic analyses. The first PCR-based sexing of a pre-implantation bovine embryo took place in the early 1990s using DNA extracted from a single biopsied blastomere from a 16–32-cell morula [116]. Similar studies followed, with blastomere biopsies from 8- to 16-cell [117] and 16- to 32-cell bovine morulae [118] and trophoblast cell biopsies from bovine blastocysts [119]. The first bovine-embryo-related study to utilize PCR for a non-sexing purpose studied the temporal expression dynamics of the gap junction gene *Cx43* [120]. Since then, PCR (especially quantitative real-time PCR) has been used extensively to study various aspects of pre-implantation bovine embryos, including EGA [80,121], early lineage specification [80,122], and the effects of superovulation on embryos [123], and to validate gene expression data from dozens, if not hundreds, of microarray and RNA-seq studies.

An important prerequisite for successful PGD is the need to perform embryo biopsy without affecting embryo viability/competence. As reviewed elsewhere, pregnancy rates of 31–63% have been obtained by different groups after transferring biopsied pre-implantation bovine embryos [124]. Only a handful of studies have directly compared pregnancy rates resulting from transferring biopsied and intact embryos. One of them observed a ~15% reduction in the pregnancy rate when transferring biopsied blastocysts, while others did not (Table 6). This lack of agreement between studies could be attributed to varying conditions between the studies, such as the number of biopsied blastomeres, the gestation length at the time of pregnancy testing, and variations among recipients.

Table 6. Comparison of pregnancy rates resulting from transfer of biopsied and non-biopsied bovine embryos.

Source	Type of Embryo	Number of Embryos	Pregnancy Rate (PR)	Observations
Mullaart and Wells, 2018 [125]	Biopsied (IVD)	1190	46%	PR different at 5 months ($p < 0.05$)
	Intact (IVD)	13,067	54%	
de Sousa, da Silva Cardoso, 2017 [126]	Biopsied (IVD)	380	54%	PR not different at 60 days ($p > 0.05$)
	Intact (IVD)	229	56%	
	Biopsied (IVP)	91	26%	PR not different at 60 days ($p > 0.05$)
	Intact (IVP)	227	20%	
Fisher, Hyndman, 2012 [127]	Biopsied (IVP)	42	43%	PR not different at 65 days ($p > 0.05$)
	Intact (IVP)	42	38%	

3.2.2. Omics-Based Embryo Analyses

PGD is carried out to *diagnose* a specific trait of interest (e.g., sex, chromosomal aberration, or a genetic disease, esp. in humans). In contrast, with the advancements in the "omics", pre-implantation embryos can be screened for entire genomes (also known as pre-implantation genomic/genetic screening: PGS), transcriptomes, epigenomes, proteomes, and metabolomes. These tools can provide quantitative and statistically accurate insights about not just a handful of molecules but hundreds, if not thousands, of potential biomarkers. This massive amount of data can also be used to understand functional relationships among identified *markers*, i.e., in cellular pathways/networks [128,129]. As such, omics-related studies have been carried out extensively over the last three decades in search of that gold standard test for the pre-transfer evaluation of embryos and in an attempt to further understand pre-implantation embryo development. The following sections examine the various types of studies that have taken place in the "omics" related to pre-implantation bovine embryos.

Genomic Studies

Genomic selection is widely used in dairy [130] and beef [131] breeding programs today. Genomic estimated breeding values (GEBVs) are currently calculated after the birth of calves [132]. This practice creates some degree of *wastage* in the form of calves that do not meet the expected minimum genetic merit/GEBV and all the resources that have gone into bringing such calves to life, e.g., the dams/surrogates that gestated them. These wastages can be minimized by using pre-implantation genomic screening (PGS) to screen blastocysts for favorable health, production, and reproduction traits prior to their

transfer to a recipient [125,133,134]. Such an approach will enable the transfer of only the best embryos, not only avoiding the previously mentioned wastages but also improving the selection intensity and shortening the generation interval, leading to faster genetic gains [124,125,132]. Large-scale commercial applications of PGS are possible today due to the availability of affordable single-nucleotide polymorphism (SNP) chips [124,132,135] and GEBVs with reliabilities approaching 70% [125].

Genomic studies using SNP genotyping have been carried out in pre-implantation bovine embryos mainly to test for aneuploidy [132,135–137], chromosomal aberrations [136,138], and karyomapping [135,139] to date. After identifying euploid embryos for transfer (from karyomapped IVP embryos), live calves were born, demonstrating that genomic/SNP studies indeed have ground-level applications [135].

Microarray for Transcriptome Profiling

Genetic evaluations of pre-implantation embryos that started in the form of PGD evolved to high-throughput methods that could rapidly screen entire transcriptomes around the dawn of the 21st century. These transcriptome-wide studies not only allow the study of many thousands of genes simultaneously but also help make biological sense of the underlying pathophysiology by identifying biological pathways or networks that are differentially affected between groups of samples [129].

The very first transcriptome-wide studies involving bovine embryos were carried out using suppression-subtractive hybridization (SSH) in 2002–2004 [140,141]. The first microarray study on bovine embryos was reported in 2004 [142]. The research group compared the transcriptomes of IVD and IVP blastocysts using a custom-made bovine microarray. The next decade saw several dozen microarray studies carried out to study various aspects of pre-implantation bovine embryo development using several commercial and *homemade* cDNA and oligonucleotide microarray platforms (Table 7).

Table 7. Applications of microarray technology in bovine embryo evaluation and analysis.

Microarray Platform Used	Objective/s of the Study	Source
Bovine cDNA microarray developed in-house	To compare IVD and IVP blastocysts	[142,143]
BlueChip cDNA microarray, Universite Laval, Quebec, Canada	To compare in vivo derived 2-cell embryos, 8-cell embryos, blastocysts, and GV oocytes	[144]
	To discover genes that will predict the post-transfer fate of embryos	[145,146]
	To study the effects of embryo microenvironment using a well-of-the-well (WOW) system	[147]
	To compare IVD and IVP pre-implantation stages (2-, 4-, and 8-cell stages, morulae, and blastocysts)	[148]
	To compare blastocysts derived from IVP and parthenogenesis	[149]
Affymetrix GeneChip® Bovine Genome Array, CA, USA	To study the effects of metabolic regulators on blastocysts	[150]
	To test the effects of different culture media on IVP embryos	[151]
	To study transcriptomic dynamics at EGA (8-cell stage)	[152]
	To identify stage-specific expression patterns of in vivo developing 2-cell, 4-cell, and 8-cell stages and of morulae and blastocysts	[153]
	To study effects of elevated progesterone on blastocyst development	[154]
	To compare degenerated and healthy-looking IVP blastocysts	[155]
	To study sex-specific gene expression patterns of blastocysts	[156]
	To identify transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after ET	[157]
	To study the effects of superovulation on embryo development	[158]
	To study the transition of a spherical blastocyst to an ovoid conceptus	[159]
	To study the effects of metabolic regulators on blastocysts	[150]
	To study cell lineage specification of blastocysts	[160]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 7. *Cont.*

Microarray Platform Used	Objective/s of the Study	Source
EmbryoGENE Bovine Microarray, Agilent, CA, USA	To study EGA and effects of in vivo and in vitro culture conditions on early embryo development	[161]
	To study the effects of hyperglycemic stress on IVP blastocysts	[162]
	To study the effects of oxidative stress on IVP blastocysts	[163]
	To compare the ICM and TE between IVP and IVD embryos	[164]
	To study the effects of non-esterified fatty acid (NEFA) concentrations on blastocysts	[165]
	To compare effects of vitrification and slow freezing on morulae and blastocysts	[166]
	To study effects of bull age on blastocysts	[167]
	To identify transcriptomic predictors of pregnancy outcomes	[168]
	To study effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure of bovine oocytes on early embryonic development	[169]
	To model a gene signature predictive of embryonic survival	[170]
Bovine gene expression microarray V2, Agilent, CA, USA	To study the transcriptomic profile related to bovine pluripotency	[171]
3995 bovine cDNA microarray developed in-house	To study temporal changes during peri-implantation developmental stages (7–28-day-old embryos)	[172]
7872 bovine cDNA microarray developed by University of Illinois, Urbana-Champaign	To compare IVD and somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocysts	[173]
2640 bovine cDNA microarray developed in-house	To compare IVP- and SCNT-derived blastocysts	[174]
5000 bovine cDNA microarray developed in-house	To compare IVP- and SCNT-derived blastocysts	[175]

In some of these studies, RNA was extracted from whole embryos [142–144], making it a useless approach for pre-transfer embryo evaluation. Nevertheless, such studies are still useful for further studying pre-implantation embryo development from a research perspective. However, many other microarray studies have been carried out by extracting RNA from biopsies of ~30–40% of the intact embryo. During one such study, the remaining 60–70% of the embryos were allowed to expand in vitro, and the resulting demi-blastocysts were transferred to recipients. A 30% pregnancy rate was achieved in this study. Further, by comparing the transcriptomes of blastocysts that succeeded in a live birth *vs*. those that did not, they found potential candidate genes that are associated with the post-transfer pregnancy outcome [145,146]. Such gene expression signatures may serve as markers for evaluating pre-transfer embryos. Therefore, microarray technology indeed has the potential to be used in the pre-transfer evaluation of embryos in the dairy and beef industries.

With the advent of RNA-sequencing (RNA-seq) technology, a transcription profiling approach superior to microarrays in many ways [176,177], the popularity of microarrays gradually started decreasing. There seemed to be an obvious shift to RNA-seq from microarrays starting in ~2012, even among those engaged in pre-implantation bovine embryo research. This is clearly reflected in the publication record on Pubmed.gov (Figure 3).

RNA Sequencing (RNA-Seq) for Transcriptome Profiling

The very first RNA-seq study of bovine embryos was carried out in 2010 to compare the transcriptomes of *healthy-looking* and *degenerated* IVP blastocysts using the Genome Analyzer platform by Illumina [178]. Since then, several dozen RNA-seq studies have been carried out to study various aspects of pre-implantation bovine embryo development using several commercially available platforms (Table 8). Some of these studies used pooled RNA [25,178–180], some used RNA from individual embryos [181,182], and others used RNA from embryo biopsies [183,184], including from those as little as single blastomeres [185,186]. However, extracting minute quantities of RNA from single cells will require the RNA to be amplified, which can lead to undesirable complications.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

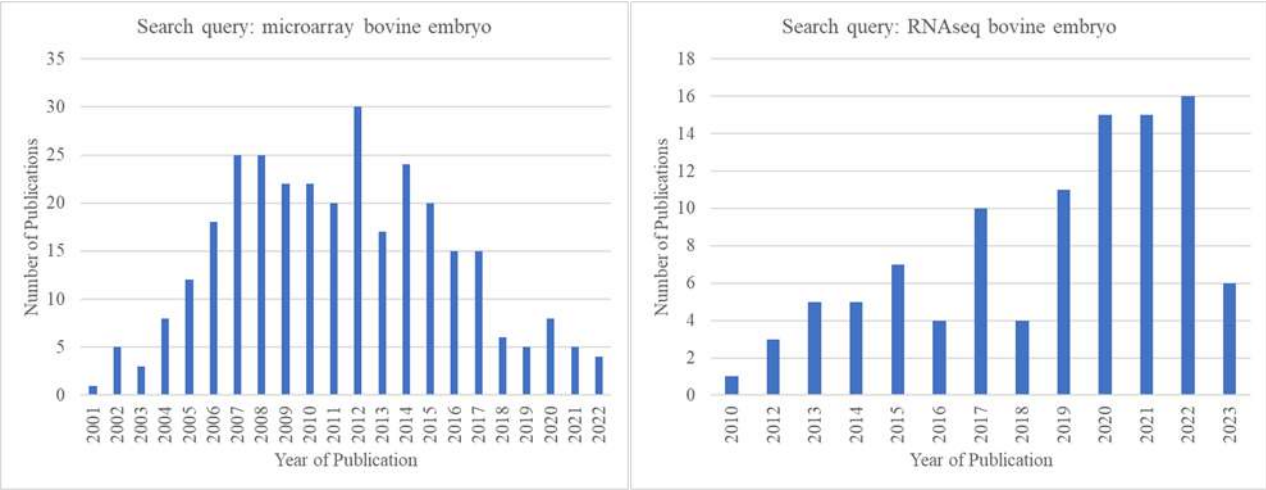


Figure 3. Comparison of the number of publications identified in Pubmed.gov (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/, accessed on 15 May 2023) by year for the search queries "microarray bovine embryo" and "RNA-seq bovine embryo" showing that after the year 2012, microarray-related publications declined, and RNA-seq-related publications increased.

Table 8. Applications of RNA-sequencing technology in bovine embryo evaluation and analysis.

RNA-Seq Platform Used	Objective/s of the Study	Source
Genome Analyzer, Illumina, CA, USA	To compare healthy-looking and degenerated IVP blastocysts	[178]
	To study maternal recognition and implantation using 7-, 10-, 13-, 16-, and 19-day-old bovine embryos	[179]
	To study EGA using 4-cell, 8-cell, 16-cell, and blastocyst stages	[180]
	To demonstrate that RNA-seq can be carried out using RNA extracted from individual blastocysts	[181]
	To identify microRNA (miRNA) in culture media of embryos of differing developmental competence	[187]
HiSeq 1500™ system, Illumina, CA, USA	To study the function of the lineage-specific gene *OCT4* (by knocking it out using CRISPR/Cas-9 system)	[79]
	To study EGA using single-blastomere RNA-seq	[186]
	To study the role of *OCT4* in the second lineage differentiation	[188]
HiSeq 2000™ system, Illumina, CA, USA	To compare morphologically similar IVD and IVP blastocysts	[25]
	To demonstrate that RNA-seq can be carried out using RNA extracted from single ICM and TE cell "biopsies"	[189]
	To study the paternal genetic contribution on pre-implantation IVP blastocysts	[190]
HiSeq 2500™ system, Illumina, CA, USA	To study miRNA expression in zygotes	[191]
HiSeq 3000™ system, Illumina, CA, USA	To test the effects of DKK1 (WNT antagonist) during the morula and blastocyst stages	[192]
HiSeq 4000™ system, Illumina, CA, USA	To study the paternal genetic contribution in pre-implantation IVD blastocysts	[193]
NextSeq™ system, Illumina, CA, USA	To identify transcriptomic signatures predictive of establishing and maintaining gestation	[183,184]
	To study chromatin remodeling events during EGA	[194]
HiSeq X Ten™ system, Illumina, CA, USA	To study paternally contributed RNAs (sperm-derived RNAs) in pre-EGA (2-cell and 4-cell) embryos	[195]
	To determine the role of the chromatin remodeler SMARCA5 in blastocysts	[196]
	To determine the role of the NOTCH signaling pathway in early embryonic development	[197]
	To study the spatiotemporal translational regulation during pre-implantation development	[198]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 8. *Cont.*

RNA-Seq Platform Used	Objective/s of the Study	Source
NovaSeq6000™ system, Illumina, CA, USA	To study lipid-metabolism-associated gene expression in parthenogenetic embryos	[199]
	To study the functional consequences of three critical lineage-specific genes (*SOX2*, *OCT4*, and *CDX2*)	[182]
	sexing of embryos	[200]
5500xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA, USA	To compare 2-cell to 16-cell embryos and early morulae and blastocysts to human and mice embryos	[201]
	To quantify transcript abundance of imprinted genes	[202]
	To detect embryo developmental potential by single-blastomere RNA-seq	[185]

Transferring 12 demi-embryos remaining after biopsy for RNA extraction, Zolini, Block, 2020 [183], achieved 5 pregnancies (41.7%) at 60 days of gestation, demonstrating that blastocysts tested by RNA-seq can indeed be used for the pre-transfer evaluation of bovine embryos.

Proteomics

The embryonic proteome is generally considered a better reflection of the actual embryo dynamics than the transcriptome for two reasons. First, it is proteins, metabolites, and other small molecules that are usually the final players in cellular/physiological events. In contrast, transcripts are usually intermediate players. Second, embryos are transcriptionally quiescent during the first few cleavages until EGA takes place. During this phase, embryo development is mainly controlled by oocyte-derived RNAs and proteins [203,204]. In contrast to the relatively invasive methods of embryo evaluation discussed earlier (e.g., genomics, transcriptomics, and even certain types of microscopy), proteomic studies can be carried out relatively non-invasively by analyzing embryos' secretomes present in the culture media.

Proteomic analyses of pre-implantation embryos have been carried out to study early lineage specification [204], EGA [203], stage-specific proteome dynamics during pre-implantation development [203,205], differences between IVP and IVD embryos [206], proteomes of the blastocoel fluid [207], primitive yolk sac fluid [208], and trophectoderm [209], and to identify embryotrophic factors in the secretome that can serve as biomarkers of high-quality embryos [210].

Traditionally, proteomic profiling was performed using 2D gel electrophoresis and Western blotting. However, modern studies use a variety of mass-spectrometry-based technologies, such as Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS), Nanoliquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (nanoLC-MS/MS), and Nano-HPLC Tandem Mass Spectrometry.

Metabolic Profiling

The metabolome is a downstream representation of the transcriptome and proteome because metabolites are the final products of cellular functions mediated by the transcriptome and proteome. As such, a strong association has been observed between embryo physiology and its metabolic profile, prompting researchers to develop metabolomics-based biomarkers. Similar to proteomics, the metabolic profile of pre-implantation embryos can be analyzed in a highly non-invasive fashion, making it a powerful tool for pre-transfer or pre-cryopreservation embryo evaluation. The metabolic profile for a specific metabolite can be measured as the quantity (i) consumed/taken up or (ii) released by the embryo. The evaluation of the embryo microenvironment, i.e., spent culture media, can give a reasonably accurate picture of both of the above measurements for individual metabolites or the entire metabolome [10,23,211].

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

The very first report on measuring metabolites in bovine blastocysts goes back to 1988 [212] when a team of researchers measured glucose, pyruvate, and glutamine, substrates related to energy metabolism. Initial studies in the 1980s and the first half of the 1990s focused on substrates related to energy metabolism, such as glucose, pyruvate, and glutamine. Later on, researchers studied oxygen, too, as an indicator of overall metabolic activity because the generation of cellular energy *via* mitochondrial oxidative phosphorylation is oxygen-dependent [213,214]. Over the last decade, many other candidates have been identified and tested by various research groups (Table 9).

During the pre-2000 era, mostly fluorometric or reverse-phase HPLC assays were used to quantify individual metabolites, such as glucose, lactate, pyruvate [215], and amino acids [216]. In addition, tools such as nanorespirometers (to measure oxygen consumption; [217]), embryoscopes with built-in oxygen microsensors (to measure oxygen consumption; [218]), REDOX sensors (to measure the production of ROS; [218]), and multi-sensor systems that can measure oxygen, glucose, and lactate concentrations simultaneously [219] had also been developed/used to evaluate the metabolic profiles of bovine embryos.

With massive developments in biomedical technologies, these techniques were replaced by mass spectrometry (MS)-based metabolomics, which allows the mass detection of metabolites, i.e., the metabolome, concurrently (e.g., >10,000 metabolites; [220]). These processes typically consist of two steps: separation using chromatography, followed by detection using MS. Examples of such methodologies used to date are Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry (UHPLC-TOF MS; UHPLC-TOF MS; [220,221]), Gas Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-qTOF; [12]), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR; [222]), and Raman Spectroscopy [223]. In addition to MS-based techniques, high-resolution nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) spectroscopy [224,225] has also been used for metabolomics studies of pre-implantation bovine embryos.

Metabolomics has been used not only to identify embryonic viability markers of bovine embryos but also to determine the sex of the embryo [220–222,224,226].

Table 9. Metabolites analyzed in bovine embryos.

Analyzed Metabolite or Indicator of Metabolism	Source/s
Glucose	[212,215,227–230]
Pyruvate	[212,215,225,228,229,231]
Lactate	[215,224,225,229,231]
Amino acids	[212,216,220,221,224–229,231–233]
Fatty acids	[221,234,235]
Oxygen	[217,218,229,236]
Reactive oxygen species (ROS)	[218]
Myo-inositol	[224,231]
Citrate	[224,231,233]
Formate	[224,231]
Prostaglandins	[221]
Biotin	[220]

3.2.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Nuclear magnetic resonance (NMR) is used extensively in hospitals and research centers for non-invasive in vivo diagnostic procedures (e.g., commonly known as MRI scanners). In contrast to the ionizing radiation of X-ray and computed tomography (CT scanning), which can be harmful to live cells, the non-ionizing radiation of NMR is considered harmless or minimally harmful to live cells and therefore can be used to identify and quantify biologically important markers in intact cells, embryos, extracts, or the secretome [237,238]. In fact, several research groups have already used NMR spectroscopy to discover metabolome-based biomarkers that can predict fetal sex and the future development and implantation of bovine embryos [224,225,231,238]. Once these biomarkers are

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

identified by NMR, simple enzymatic assays can be developed to identify/quantify such markers without the need for sophisticated NMR equipment [237]. As such, there is great potential for metabolomic biomarkers, identified by NMR or other means, to have practical applications in non-invasive embryo evaluation in the bovine ET industry.

ART-related applications of NMR, including those used for the evaluation of embryos, have been reviewed in detail elsewhere [237].

3.2.4. Less Commonly Used Tools

In addition to the methods described above, pre-implantation bovine embryos have been studied using a variety of other tools too (Table 10).

Table 10. Miscellaneous tools/techniques used to analyze bovine embryos.

Marker Measured/Methodology	Equipment/Methodology Used	Source/s
Apoptosis	TUNEL assay	[71,239,240], reviewed by [241]
Ribosome profile	High-resolution ribosome fractionation, polysome profiling, RNA-seq	[198]
DNA methylation landscape	Anti-5-methylcytosine (5-MeC) antibody, methylation-sensitive high-resolution melting analysis (MS-HRM), bisulfite sequencing	[75,242–248]
mRNA localization	In situ hybridization	[63,80,249,250]
Chromosomal abnormalities	5% Giemsa staining (1250× magnification)	[251]
Automation/artificial intelligence (AI)-based microscopy	Use of genetic algorithms, artificial neural networks, automatic feature extraction from images and supervised learning to formulate AI-based computer-assisted scoring systems (CASS)/predictive models	[1,252–256]
Gene knockdown	Cytosine base editing, CRISPR/Cas-9 gene editing, siRNA-mediated gene knockdown	[79,182,196,197,257]
Characterization of extracellular vesicles	Nanoparticle tracking analysis, electron microscopy, small RNA sequencing	[258–260]
Multi-omics approaches	Integrating transcriptomic and epigenetic data and integrating metabolomics and epigenetic data	[261,262]

4. Discussion

Nearly 1.5 million bovine embryos were transferred in 2021. Of these transfers, nearly 80% (~1.2 million) involved IVP embryos [2]. Despite the massive advancements in every aspect of IVP, only ~27% of them can be expected to produce a live calf [4]. While the causes of pregnancy failures are multi-factorial, part of the problem is the inadvertent transfer of low-quality embryos due to our incompetence in accurately distinguishing high-quality embryos from low-quality ones. The current method of choice for embryo evaluation, i.e., morphological evaluation using a stereomicroscope, is considered to be subjective and to have poor accuracy and reproducibility [1,5]. Over two decades of research has gone into discovering a replacement tool for manual morphological evaluation, yet nothing concrete has come out that is adoptable at the ground level.

4.1. Microscopic Techniques

Of the visualization methodologies discussed, stereomicroscopy is the most commonly used tool for the pre-transfer/pre-cryopreservation evaluation of bovine embryo/blastocyst quality. However, the methodology is plagued by human subjectivity and poor accuracy.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Electron microscopy and fluorescent microscopy have contributed immensely to the current knowledge about pre-implantation bovine embryo ultrastructure and the intraembryonic/intracellular localization of mRNAs and proteins (through FISH, immunocytochemistry, etc.). However, because sample preparation procedures make the embryos non-viable, they are both invasive techniques of no value for live embryo evaluation.

GLIM is superior to the abovementioned microscopic techniques because it is label-free and non-invasive and captures real-time 3D images of thick embryos, overcoming multiple scattering. Additionally, it takes ~1 min for image acquisition and <5 min for the virtual reconstruction of the image. As such, GLIM can be used for live embryo evaluation without affecting their viability. However, the equipment is expensive and sophisticated and requires a high level of technical expertise to operate. Therefore, it is highly unlikely to have practical applications in the dairy or beef cattle industry in the immediate future.

TLM allows the temporospatial evaluation of embryos and thus can be used to study embryo morphokinetics. Several MKIs predictive of embryo viability/quality have been discovered using TLM; however, the procedure requires embryos to be cultured and tracked individually using expensive imaging equipment. Therefore, however powerful a tool it may be, TLM too is highly unlikely to be adopted by the masses in the immediate future.

4.2. Non-Microscopic Techniques

The most common omics-based methodologies that have been used to study pre-implantation bovine embryo development to date are related to transcriptomics and metabolomics. Relatively few studies have been carried out using SNPs, proteomics, and epigenomics. There is no doubt that many of the discussed "omics" technologies have succeeded in discovering embryo viability/quality markers. However, when it comes to in-field applications of these technologies, they pose more questions than they provide answers. For example, if transcriptomics were to be adopted for in-field embryo evaluations, would it be realistic to biopsy and extract RNA from 2 million embryos (the approximate annual cattle embryo production) and then to run 2 million microarrays/RNA-seq? Would these steps take place at the embryo production/collection facilities? Or would embryos get transported to a different facility? If they are transported out, embryos may need to be frozen for transporting and thawed out before testing. Because there will be an interval of several days between the biopsy and the availability of results after bioinformatic analyses, embryos will need to be refrozen, and the ones that *pass the tests* will need to be re-thawed before ET. It is well known that freezing and thawing, let alone refreezing and re-thawing, can have undesirable effects on embryo quality/viability [263]. Compared to transcriptomics testing, proteomics and metabolomics are considered non-invasive because it is the culture medium that is analyzed and not the embryo *per se*. However, these require embryos to be cultured individually for their individual secretomes to be analyzed. If proteomics or metabolomics were to be adopted at the ground level, would it be practically possible to culture two million embryos individually using WOW systems? Additionally, even if this mammoth feat could be accomplished, the same set of challenges as with transcriptomics will need to be dealt with.

Therefore, it is clear that while these tools are extremely powerful and useful for understanding pre-implantation embryo development/physiology, it is almost impossible for them to have direct in-field applications in live embryo evaluation.

4.3. The Ideal Embryo Evaluation Tool

One of the key characteristics of the ideal embryo evaluation tool would be its adoptability by the thousands of embryo-producing/collecting facilities. Such a tool should fulfill most, if not all, of the following seven criteria:

1. The method should provide accurate results;
2. It should be non-invasive;
3. It should be objective (minimize human subjectivity);
4. It should be [illegible] (minimal handling costs);

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

5. It should be technically simple enough to be carried out at the embryo production facility itself;
6. The evaluation should be completed by blastulation so that high-quality blastocysts can be immediately identified for direct transfer, without a lag period like in the case of omics-based techniques;
7. The results should be available within hours of sample collection so that a second freeze–thaw cycle can be avoided.

Based on Table 11, which compares the common tools of embryo evaluation according to the above criteria, none of the tools fulfill all criteria. However, TLM and AI-based microscopy satisfy the highest number of favorable criteria (green boxes).

Table 11. Comparison of the different tools available for embryo evaluation (green indicates a favorable feature, whereas orange indicates an unfavorable feature).

	Accuracy	Invasive Nature	Subjectivity	Initial Cost and/or Cost of Operation	Technical Complexity	Evaluation Complete by Blastulation	Need Extra Freezing Step
Stereoscopy	Low	Low	High	Low	Low	No	No
Fluorescence microscopy	High	High	Low	High	High	N/A **	N/A **
Electron microscopy	High	High	Low	High	High	N/A **	N/A **
GLIM	High	Low	Low	High	High	No	No
TLM	High	Low	Low	High	Low	Yes	No
AI-based microscopy	High	Low	Low	Low	High	No	No
Genomics	High	High *	Low	High	High	No	Yes
Transcriptomics	High	High *	Low	High	High	No	Yes
Proteomics	High	Low	Low	High	High	No	Yes
Metabolomics	High	Low	Low	High	High	No	Yes
NMR	High	Low	Low	High	High	No	Yes

* If blastomere biopsies are tested instead of whole embryos, embryos will still be viable and can be used for ET post-testing, but it is nevertheless considered invasive. ** Embryos lose viability before/during evaluation, and therefore, these criteria are non-applicable.

TLM fulfills a criterion that others do not: i.e., TLM can complete the embryo evaluation by the time that blastulation takes place by virtue of analyzing the morphokinetics of the first few cleavages. TLM studies have been used to demonstrate that MKIs such as the timing of the first cleavage, the number of blastomeres at the first cleavage, and the number of blastomeres at the onset of the lag phase have a strong correlation with post-transfer pregnancy rates [94,95]. These pre-blastulation observations have even led some to argue that MKIs can replace the IETS' morphology-based grading system [81]. However, the major obstacle to using MKIs is the need to keep track of individual embryos during culture using WOW systems and sophisticated and expensive TLM imaging equipment. Therefore, we emphasize the need for future research to focus on designing affordable imaging alternatives that can be incorporated into existing incubators. A standalone camera or a smartphone that can be placed inside the incubator and is capable of communicating with a computer via WiFi may suffice for this purpose. For example, de Souza Ciniciato, Takahashi, 2017 [255] and Guilherme, Pronunciate, 2018 [252], used a smartphone to capture digital images of blastocysts with limited success. Considering that a successful embryo evaluation method will need to be adopted by the masses and

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

that everybody has access to smartphones nowadays, we believe that further research needs to be carried out to understand how image capture using smartphones can be used in embryo evaluation, especially in TLM. Smartphone-compatible macro lenses claiming up to 400× magnification and timer-based photography applications are available on the market that may suffice for this type of relatively simple application. Smartphone-based biomedical applications are currently being used in various diagnostic, histopathological, and microbiological applications [264–266].

AI-based automated microscopy has been used to process and analyze images in an objective and automated fashion. Using artificial neural networks (ANNs), genetic algorithms (GAs), and automated image processing, embryo quality was classified with a high success rate [1,253]. We believe that this technology has a high potential for *in-field* embryo evaluation considering its benefits outlined in Table 11. It is well established that subtle variabilities in color, brightness, shape, and features escape the human eye [267] simply due to limitations in the physiological capacity of the human eye and variabilities in the embryologist's accuracy, experience, and mood [7]. Automated image processing with objective image analysis, aided by machine learning, can overcome these limitations of the human eye.

Certain commercial TLM systems already make use of automatized image processing to a certain degree. We believe that if AI-based evaluation can be combined with TLM in a manner affordable to the masses, it has the potential to be used for *in-field* embryo evaluation.

4.4. Application of Omics-Based Tools in Field Conditions

In contrast to AI-based microscopy and TLM, omics-based technologies have major limitations that prohibit the direction application of these tools under field conditions, e.g., the need for technical expertise for operation and the need for additional freeze–thaw cycles. However, this does not mean that omics-based methods, GLIM, or NMR cannot be used for in-field embryo evaluation. Even though they cannot be used directly *in-field*, they can be used indirectly to narrow down embryo viability biomarkers, which may be detected *in-field* using simpler methodologies. For example, using mass-spectrometry-based proteomics screening of culture media, Raes, Wydooghe, 2023 [210], found that media conditioned by excellent- and good-quality bovine embryos, but not poor-quality embryos, contain cathepsin-L. If cathepsin-L is to be adopted as a bovine embryo viability/quality biomarker for embryo evaluation, mass spectrometry need not be carried out at the ground level. Instead, a simple protein detection methodology such as ELISA, which is non-invasive, simple, affordable, and adoptable by the masses, could be developed for the in-field detection of cathepsin-L. Alternatively, culture media could be developed that change color in the presence of high concentrations of cathepsin-L.

The majority of studies carried out to date have limited their objectives to finding an association between biomarker signatures and blastocyst quality. Only a handful of studies have gone on to correlate biomarker signatures with pregnancy outcomes. We strongly recommend that future studies emphasize investigating correlations between pre-implantation embryo biomarker signatures and pregnancy outcomes. This applies not only to omics-based biomarkers but also to other tools, including microscopic techniques.

5. Conclusions

Pre-implantation bovine embryo evaluation has come a long way, from simple microscopic analysis in 1931 to PCR-based analyses in the 1990s to omics-based analyses in the 21st century (Figure 4). The ideal embryo evaluation tool should be not only accurate, objective, non-invasive, and affordable but also simple enough to be adopted by the thousands of embryo production/collection facilities worldwide. As such, under the current circumstances, it is highly unlikely that transcriptomics, proteomics, metabolomics, GLIM, NMR, etc., can be directly used for *in-field* embryo evaluation. However, biomarkers identified by these methodologies could be used for *in-field* embryo evaluation by devising simple, affordable *heughton* techniques. Further research on TLM and AI-based automated

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

image processing is warranted to make them more affordable (esp. TLM), as we see great potential for these methodologies to be adopted by the masses, provided they can be made affordable.

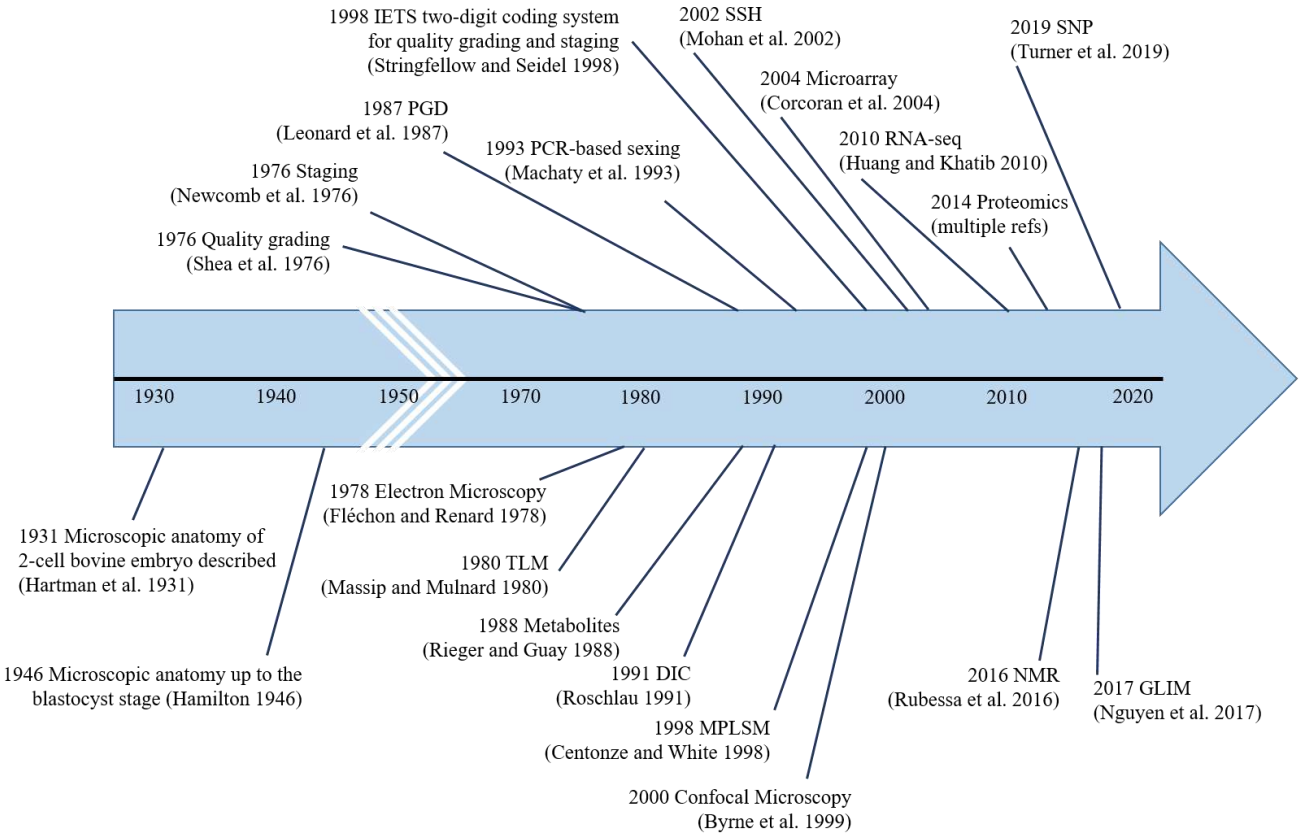


Figure 4. Major milestones in pre-implantation bovine embryo analysis. The first instance of the use of each methodology is indicated, i.e., microscopic anatomy [13,14], quality grading [16], staging [21], electron microscopy [41], time-lapse microscopy [92], genetic-testing [113], metabolite-testing [212], differential interference contrast microscopy [30], PCR-based sexing [116], IETS two-digit coding system [20], multi-photon laser scanning microscopy [85], confocal microscopy [71], suppression subtractive hybridization [140], microarray [142], RNA-seq [178], proteomics, nuclear magnetic resonance [231], gradient light interference microscopy [58], and single nucleotide polymorphisms [139].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani13132102/s1: Figures S1–S19. Figure S1. 100× DIC. Stage 5 Grade 1 embryo. Early blastocyst collected day 7 post onset of estrus. Notice the presence of blastomeres immediately inside the VM causing an irregular bulge, or bumpy edge to the VM. The inner cell mass plus the blastocoele and VM is collectively called the embryo proper. Compare the bulges on the VM of this early blastocyst to the very smooth non-bulging VM of the unfertilized ova (UFO). *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S2. 100× DIC. Same embryo as slide #4 and #5, but arrows point to individual blastomeres. Also, one fused blastomere is outlined in yellow*[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S3. 400× DIC. Stage 4, Grade 1. This is an anatomically near perfect day 7 morula. There are very few, if any, extruded blastomeres outside the VM. The differentiating factor between this and a UFO is the bulging of the blastomeres in this embryo causing the VM to be irregular, yet contiguous and visible. Close inspection of the embryo proper allows one to see a large mass of fused blastomeres. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S4. 400× BF. Stage 4, Grade 2. Arguably, this embryo could be considered a grade 1 instead of a grade 2. The main mass (circled - see next slide) has a very well defined VM covering a healthy group of well fused blastomeres. In the visible plane there are two large extruded blastomeres. Rolling the embryo revealed two more smaller ones on the back side.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

This is a good example of the subjectivity involved in grading embryos. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S5. 100× DIC. Stage 4, Grade 3. This morula has several extruded unfused cells (arrows) in this plane, plus a few others as it was observed while rolling. The healthy fused mass in the middle represents about half of the total blastomeres. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S6. 200× BF. Stage 5 Grade 1. The arrow points to the "hollow" early developing blastocoele cavity. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S7. 400× DIC. Stage 5, Grade 3. The viable cells in this embryo have differentiated and formed a blastocoele (lower left part of encircled cell mass–see next slide–hollow cavity). The remainder of the cells are unfused and dead. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S8. 200× DIC. Stage 6, Grade 1. The yellow arrow points to the blastocoele cavity. The lighter colored blastocoele has slightly more total volume than the inner cell mass. That is the standard for classifying the embryo as a late-stage blastocyst (stage 6). The blue arrow points to the trophoblast. The red arrow points to the inner cell mass. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S9. 100× DIC. Stage 6, Grade 1. The blastocoele is about twice the size of the inner cell mass. The embryo proper has grown to the point that the VM now contacts the zona, thus eliminating a visible perivitelline space. However, the zona has not begun to expand geometrically and thin, thus this embryo is classified as a Stage 6 instead of Stage 7 (expanded blastocyst). One important point should be noted about embryos that have no perivitelline space–many of these embryos will be classified as Grade 1's because any extruded blastomeres are flattened between the VM and the zona, and are, therefore often difficult to visualize. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S10. 100× DIC. Stage 6, Grade 2. Although the embryo proper has no imperfections, the zona is severely cracked and torn at 9 o'clock resulting in a down Grade from a 1 to a 2. This embryo would not qualify for export. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S11. 100× DIC. Stage 6 (arguably a stage 5), Grade 3. When this embryo was rolled during evaluation it was easier to see that the blastocoele (circle–see next slide) was slightly larger than the inner cell mass. Also, about half of the total cell mass was dead making the embryo a Grade 3. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S12. 100× DIC. Stage 7, Grade 1. The blastocoele represents about 70% of the embryo proper, and the inner cell mass (yellow arrow) is relatively smaller (about 30% of the embryo proper). The embryo proper has expanded all the way to the zona, and the zona is stretching/thinning to accommodate the growth. A thin layer of trophoblast extends from the corners of the inner cell mass and extends along the entire outer border of the blastocoele and approximates the inner border of the zona. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S13. 400× BF. Hatching blastocyst, Stage 8, Grade 1. The zona has cracked (6 to 8 o'clock) under the pressure of growth by the blastocyst. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S14. 400× BF. Stage 8, Grade 1. This is a hatched blastocyst in almost perfect condition. Normally, the ratio of blastocoele to inner cell mass would be greater than in this embryo. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S15. 100× DIC. #1 is an empty zona. See tear at 9 o'clock. Notice how the zona wall is thinner in #1 as compared to #2 and #3 (both stage 7, grade 1). #4 is a hatched blastocyst (Stage 8, Grade 1) without a zona. #1 is likely the zona that belongs to #4. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S16. 100× DIC. The three embryos with yellow arrows are Stage 7, Grade 2s. Notice the brown colored granular appearance of the blastocoele cavities of those embryos compared to the expanded blastocysts with translucent (green arrows) in this microphotograph. The granulation is an artifact of cellular debris along with dead and degenerated cells trapped tightly between the trophoblast and the zona. The green arrows point to Grade 1 embryos. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S17. 100× DIC. #1 = Stage 7, Grade 1 (7-1). #2 = 6-1, #3 = 5-1, #4 = 6-1. #5 = 6-1, #6 = 6-1,. #7 = 7-1 (notice diameter compared to bordering embryos), #8 = 5-1. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S18. 40× BF. The red arrows point to Stage 7, Grade 1 embryos. The green arrows point to Stage 6, Grade 1 embryos. The yellow arrows represent Stage 5, Grade 1 embryos. The blue arrow points to Stage 4, Grade 1s. The orange dashed arrows point to fragmented UFOs. Any embryo with a cracked zona downgrades from a Grade 1 to a Grade 2. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].* Figure S19. 40× BF. #1 = Stage 6, Grade 1. #2 = Not

MAJALAH EDISI 12 TAHUN 2023, DESEMBER 2023 Halaman 300

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

#3 = Stage 7, Grade 1. #4 - Stage 6, Grade 1. The blastocoele appears to be smaller than the inner cell mass (ICM) in this view, but when rolled, the blastocoele is larger than the ICM. #5 = Stage 7, Grade 1. Notice the large diameter, plus the thinning of zona due to physical expansion of growth. #6 = Stage 7, Grade 1 (arguably a stage 6). #7 = Stage 6, Grade 1 (arguably a stage 5). #8 = Stage 7, Grade 1. #9 and #10 = Stage 5, Grade 1. #11 and #12 = Stage 7, Grade 1. #13 = Stage 5, Grade 1 (arguably a stage 6). #14 = Stage 4, Grade 2 (arguably a grade 1). 15 = Stage 5, Grade 1. #16 = Stage 7, Grade 1. #17 = Stage 4, Grade 3. The VM is very ill defined in this embryo. The VM has a "frayed" appearance from about 12 to 6 o'clock. There are most likely a few viable fused cells in the main mass, but many of the peripheral cells are degenerated. #18 = Stage 4, Grade 2. It has dead blastomeres at 6, 7, and 12 o'clock. #19 = Stage 5, Grade 1 (arguably a stage 6). #20 = Stage 6, Grade 1. #21 = Stage 7, Grade 1 (arguably stage 6). #22 = Stage 5, Grade 1. #23, 24, and 25 = Stage 4, Grade 1. #26 = Stage 4, Grade 2. The shape of the embryo proper is geometrically non-spherical. #27 = Stage 4, Grade 2 (arguably a stage 5) due to a cracked zona at 3 o'clock. #28 = Stage 7, Grade 1. #29 = Stage 6, Grade 1. This embryo is slightly oval shaped, but has no other flaws. #30 = Stage 7, Grade 1. #31 = Stage 6, Grade 1. #32 = Stage 7, Grade 1. #33 = Stage 6, Grade 1. #34 = Stage 4, Grade 1. #35 = Stage 7, Grade 1. #36 = Stage 7, Grade 1 (arguably stage 6). #37 = Stage 4, Grade 2 (cracked zona). This embryo could be a Stage 7 with a collapsed blastocoele cavity due to physical forces during the embryo collection procedure. The diameter of the zona is noticeably larger than that of embryo 34. The crack in the zona is at about 7 o'clock. #38 = Stage 7, Grade 1. #39 = Stage 5, Grade 1. #40 = Stage 6, Grade 1. *[Figure and caption provided with permission of the International Embryo Technology Society (IETS) 2023].*

Author Contributions: Writing—original draft preparation, R.A.C.R., P.V.M., E.A.B., K.W., D.J.M. and M.B.W.; writing—review and editing, R.A.C.R., M.B.W., P.V.M. and D.J.M.; supervision, M.B.W.; project administration, M.B.W.; funding acquisition, M.B.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by the USDA Multistate Project W-4171 #ILLU-538-947 and the Ross Foundation #635148.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: As this is a review article, all data used in the preparation of this manuscript are freely available to the public.

Acknowledgments: This manuscript is dedicated to George E. Seidel, Jr. His vision started an industry, and his ideas helped the ET industry grow and prosper. Seidel's passion for the pursuit of knowledge and his students has left an everlasting legacy to humankind.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rocha, J.C.; Passalia, F.J.; Matos, F.D.; Takahashi, M.B.; Maserati, M.P., Jr.; Alves, M.F.; de Almeida, T.G.; Cardoso, B.L.; Basso, A.C.; Nogueira, M.F.G. Automatized image processing of bovine blastocysts produced in vitro for quantitative variable determination. *Sci. Data* **2017**, *4*, 170192. [CrossRef]
2. Viana, J. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technol. Newsl.* **2022**, *40*, 19.
3. Marsico, T.; De Camargo, J.; Valente, R.S.; Sudano, M.J. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Anim. Reprod.* **2019**, *16*, 423–439. [CrossRef]
4. Ealy, A.D.; Wooldridge, L.K.; McCoski, S.R. Board Invited Review: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *J. Anim. Sci.* **2019**, *97*, 2555–2568. [CrossRef]
5. Farin, P.; Britt, J.; Shaw, D.; Slenning, B. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* **1995**, *44*, 339–349. [CrossRef] [PubMed]
6. Hansen, P.J. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—Why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, skaa288. [CrossRef] [PubMed]
7. Lindner, G.M.; Wright, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* **1983**, *20*, 407–416. [CrossRef]
8. Schneider, H.; Castleberry, R.; Griffin, J. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology* **1980**, *13*, 73–85. [CrossRef] [PubMed]
9. Tervit, H.; Cooper, M.; Goold, P.G.; Haszard, G. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology* **1980**, *13*, 63–71. [CrossRef]
10. Donnay, I. Metabolic Markers of Embryo Viability. In *Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and Non-Invasive Techniques*; Van Soom, A., Boeuing, M., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2002; pp. 57–94.

11. Bó, G.; Mapletoft, R. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod. (AR)* **2018**, *10*, 344–348.
12. Gomez, E.; Canela, N.; Herrero, P.; Cereto, A.; Gimeno, I.; Carrocera, S.; Martin-Gonzalez, D.; Murillo, A.; Muñoz, M. Metabolites Secreted by Bovine Embryos In Vitro Predict Pregnancies That the Recipient Plasma Metabolome Cannot, and Vice Versa. *Metabolites* **2021**, *11*, 162. [CrossRef]
13. Hartman, C.G.; Lewis, W.H.; Miller, F.W.; Swett, W.W. First findings of tubal ova in the cow, together with notes on oestrus. *Anat. Rec.* **1931**, *48*, 267–275. [CrossRef]
14. Hamilton, W.J.; Laing, J.A. Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. *J. Anat.* **1946**, *80*, 194. [PubMed]
15. Seidel, G.E. Critical Review of Embryo Transfer Procedures with Cattle. In *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*; Mastroianni, L., Biggers, J.D., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1981; pp. 323–353.
16. Shea, B.; Hines, D.; Lightfoot, D.; Ollis, G.; Olson, S. The transfer of bovine embryos. In *Agriculture Research Seminar*; Commission of the European Communities: Brussels, Belgium, 1976; pp. 145–152.
17. Elsden, R.; Nelson, L.; Seidel, G. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* **1978**, *9*, 17–26. [CrossRef]
18. Shea, B. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology* **1981**, *15*, 31–42. [CrossRef] [PubMed]
19. Newcomb, R.; Rowson, L.E.A. Conception rate after uterine transfer of cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *Reproduction* **1975**, *43*, 539–541. [CrossRef] [PubMed]
20. Stringfellow, D.A.; Seidel, S.M. *Manual of the International Embryo Transfer Society*; The Society: Burlington, ON, Canada, 1998.
21. Newcomb, R.; Rowson, L.; Trounson, A. The entry of superovulated eggs into the uterus. In *Egg Transfer in Cattle*; Commission of the European Communities: Brussels, Belgium, 1976; pp. 1–15.
22. Rocha, J.C.; Passalia, F.J.; Matos, F.D.; Maserati, M.P., Jr.; Alves, M.F.; De Almeida, T.G.; Cardoso, B.L.; Basso, A.C.; Nogueira, M.F.G. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assist. Reprod.* **2016**, *20*, 150–158. [CrossRef]
23. Donnay, I.; Partridge, R.J.; Leese, H.J. Can embryo metabolism be used for selecting bovine embryos before transfer? *Reprod. Nutr. Dev.* **1999**, *39*, 523–533. [CrossRef]
24. de México, A. Assessment of Bos taurus embryos comparing stereoscopic microscopy and transmission electron microscopy. *J. Cell Anim. Biol.* **2008**, *2*, 072–078.
25. Driver, A.M.; Peñagaricano, F.; Huang, W.; Ahmad, K.R.; Hackbart, K.S.; Wiltbank, M.C.; Khatib, H. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC Genom.* **2012**, *13*, 118. [CrossRef]
26. Antony, P.P.M.A.; Trefois, C.; Stojanovic, A.; Baumuratov, A.S.; Kozak, K. Light microscopy applications in systems biology: Opportunities and challenges. *Cell Commun. Signal.* **2013**, *11*, 24. [CrossRef] [PubMed]
27. Aguilar, M.M.; Galina, C.S.; Merchant, H.; Montiel, F.; Canseco, R.; Márquez, Y.C. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* **2002**, *37*, 341–346. [CrossRef] [PubMed]
28. Nishiwaki, S.; Narumi, K.; Korenaga, T. Interference phase-contrast imaging technology without beam separation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1753. [CrossRef]
29. Rubessa, M.; Wheeler, M.B. Label-free microscopy: A non-invasive new tool to assess gametes and embryo quality. *Theriogenology* **2020**, *150*, 241–246. [CrossRef]
30. Roschlau, K. Gene transfer studies in cattle. *J. Reprod. Fertil.* **1991**, *43*, 293–295. [CrossRef]
31. Bavister, B.D.; Rose-Hellekant, T.A.; Pinyopummintr, T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* **1992**, *37*, 127–146. [CrossRef]
32. Elmileik, A.; Maeda, T.; Terada, T. Higher rates of development into blastocyst following the in vitro fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplemented with the fluid from large bovine follicles. *Anim. Reprod. Sci.* **1995**, *38*, 85–96. [CrossRef]
33. Tominaga, K.; Shimizu, M.; Ooyama, S.; Izaike, Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16-cell embryos. *Theriogenology* **2000**, *53*, 1669–1680. [CrossRef] [PubMed]
34. Abe, H.; Yamashita, S.; Satoh, T.; Hoshi, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.* **2001**, *61*, 57–66. [CrossRef]
35. Duszewska, A.; Kozikova, L.; Szydlik, H.; Cybulska, M.; Korwin-Kossakowski, M.; Połoszynowicz, J.; Wicińska, K.; Rosochacki, S.; Waś, B. The use of green fluorescent protein (GFP) to select bovine embryos. *J. Anim. Feed. Sci.* **2003**, *12*, 71–81. [CrossRef]
36. Rosochacki, S.J.; Kozikova, L.V.; Korwin-Kossakowski, M.; Matejczyk, M.; Połoszynowicz, J.; Duszewska, A. Noninvasive fluorescent screening of microinjected bovine embryos to predict transgene integration. *Folia Biol.* **2003**, *51*, 97–104.
37. Neuber, E.; Luetjens, C.; Chan, A.; Schatten, G. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. *Theriogenology* **2002**, *57*, 2193–2202. [CrossRef]
38. Pereira, R.; Baptista, M.; Vasques, M.; Horta, A.; Portugal, P.; Bessa, R.; e Silva, J.C.; Pereira, M.S.; Marques, C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *98*, 293–301. [CrossRef] [PubMed]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

39. Pereira, R.; Carvalhais, I.; Pimenta, J.; Baptista, M.; Vasques, M.; Horta, A.; Santos, I.; Marques, M.D.R.; Reis, A.; Pereira, M.S.; et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *106*, 322–332. [CrossRef]
40. Malatesta, M. Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12789. [CrossRef]
41. Flechon, J.-E.; Renard, J.-P. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts in vitro. *Reproduction* **1978**, *53*, 9–12. [CrossRef] [PubMed]
42. Massip, A. Ultrastructure of the cow blastocyst. *J. Submicrose. Cytol.* **1981**, *13*, 31–40.
43. Crosier, A.E.; Farin, P.W.; Dykstra, M.J.; Alexander, J.E.; Farin, C.E. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. *Biol. Reprod.* **2001**, *64*, 1375–1385. [CrossRef] [PubMed]
44. Laurincik, J.; Thomsen, P.; Hay-Schmidt, A.; Avery, B.; Greve, T.; Ochs, R.; Hyttel, P. Nucleolar Proteins and Nuclear Ultrastructure in Preimplantation Bovine Embryos Produced In Vitro. *Biol. Reprod.* **2000**, *62*, 1024–1032. [CrossRef]
45. King, W.A.; Niar, A.; Chartrain, I.; Betteridge, K.J.; Guay, P. Nucleolus organizer regions and nucleoli in preattachment bovine embryos. *Reproduction* **1988**, *82*, 87–95. [CrossRef]
46. Kopečný, V.; Fléchon, J.E.; Camous, S.; Fulka, J. Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: Fine-structural autoradiographic study. *Mol. Reprod. Dev.* **1989**, *1*, 79–90. [CrossRef] [PubMed]
47. Baran, V.; Fléchon, J.-E.; Pivko, J. Nucleologenesis in the cleaving bovine embryo: Immunocytochemical aspects. *Mol. Reprod. Dev.* **1996**, *44*, 63–70. [CrossRef]
48. Laurincik, J.; Kopecny, V.; Hyttel, P. Detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vivo: Ultrastructure and cell cycle chronology. *Mol. Reprod. Dev. Inc. Gamete Res.* **1996**, *43*, 62–69. [CrossRef]
49. Laurincik, J.; Hyttel, P.; Baran, V.; Lucas-Hahn, A.; Eckert, J.; Pivko, J.; Niemann, H.; Brem, G.; Schellander, K. Pronucleus development and intranuclear bodies organization during progress of the first bovine embryonic cell cycle in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **1998**, *50*, 192–199.
50. Crozet, N. Ultrastructural aspects of in vivo fertilization in the cow. *Gamete Res.* **1984**, *10*, 241–251. [CrossRef]
51. Kuwayama, M.; Fujikawa, S.; Nagai, T. Ultrastructure of IVM-IVF Bovine Blastocysts Vitrified after Equilibration in Glycerol 1,2-Propanediol Using 2-Step and 16-Step Procedures. *Cryobiology* **1994**, *31*, 415–422. [CrossRef]
52. Shamsuddin, M.; Rodriguez-Martinez, H. Fine Structure of Bovine Blastocysts Developed Either in Serum-Free Medium or in Conventional Co-Culture With Oviduct Epithelial Cells. *J. Vet. Med. Ser. A* **1994**, *41*, 307–316. [CrossRef]
53. Abe, H.; Hoshi, H. Evaluation of Bovine Embryos Produced in High Performance Serum-Free Media. *J. Reprod. Dev.* **2003**, *49*, 193–202. [CrossRef]
54. Sollecito, N.; Alves, R.; Beletti, M.; Pereira, E.; Miranda, M.; Silva, J.; Borges, A. Morphometry of bovine blastocysts produced in vitro in culture media with antioxidants cysteamine or oily extract of *Lippia origanoides*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2021**, *73*, 799–811. [CrossRef]
55. Fair, T.; Lonergan, P.; Dinnyes, A.; Cottell, D.C.; Hyttel, P.; Ward, F.A.; Boland, M.P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* **2001**, *58*, 186–195. [CrossRef]
56. Abe, H.; Otoi, T.; Tachikawa, S.; Yamashita, S.; Satoh, T.; Hoshi, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anat. Embryol.* **1999**, *199*, 519–527. [CrossRef]
57. Plante, L.; King, W.A. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived byin Vitro andin Vivo fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* **1994**, *11*, 515–529. [CrossRef] [PubMed]
58. Nguyen, T.H.; Kandel, M.E.; Rubessa, M.; Wheeler, M.B.; Popescu, G. Gradient light interference microscopy for 3D imaging of unlabeled specimens. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 210. [CrossRef] [PubMed]
59. Sanderson, M.J.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M.D. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2014**, *2014*, pdb.top071795. [CrossRef]
60. Specht, E.A.; Braselmann, E.; Palmer, A.E. A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79*, 93–117. [CrossRef] [PubMed]
61. Sakatani, M.; Kobayashi, S.-I.; Takahashi, M. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **2004**, *67*, 77–82. [CrossRef]
62. Wang, L.-J.; Zhang, H.; Wang, Y.-S.; Xu, W.-B.; Xiong, X.-R.; Li, Y.-Y.; Su, J.-M.; Hua, S.; Zhang, Y. Scriptaid improves in vitro development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *Cell. Reprogram.* **2011**, *13*, 431–439. [CrossRef] [PubMed]
63. Slimane, W.; Heyman, Y.; Lavergne, Y.; Humblot, P.; Renard, J.P. Assessing Chromosomal Abnormalities in Two-Cell Bovine In Vitro-Fertilized Embryos by Using Fluorescent In Situ Hybridization with Three Different Cloned Probes. *Biol. Reprod.* **2000**, *62*, 628–635. [CrossRef]
64. Daigneault, B.W.; Rajput, S.; Smith, G.W.; Ross, P.J. Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7753. [CrossRef]
65. Amos, W.B.; White, J.G.; Fordham, M. Use of confocal imaging in the study of biological structures. *Appl. Opt.* **1987**, *26*, 3239–3243. [CrossRef]
66. White, J.G.; Amos, W.B.; Fordham, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 41–48. [CrossRef]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

67. Inoué, S. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*; Pawley, J.B., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2006.
68. Jonkman, J.; Brown, C.M.; Wright, G.D.; Anderson, K.I.; North, A.J. Tutorial: Guidance for quantitative confocal microscopy. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 1585–1611. [CrossRef] [PubMed]
69. Ross, P.J.; Perez, G.I.; Ko, T.; Yoo, M.S.; Cibelli, J.B. Full developmental potential of mammalian preimplantation embryos is maintained after imaging using a spinning-disk confocal microscope. *Biotechniques* **2006**, *41*, 741–750. [CrossRef] [PubMed]
70. Wang, E.; Babbey, C.M.; Dunn, K.W. Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems. *J. Microsc.* **2005**, *218*, 148–159. [CrossRef]
71. Byrne, A.; Southgate, J.; Brison, D.R.; Leese, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Reproduction* **1999**, *117*, 97–105. [CrossRef] [PubMed]
72. Matwee, C.; Betts, D.H.; King, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* **1999**, *8*, 57–68. [CrossRef] [PubMed]
73. Vanroose, G.; Nauwynck, H.; Van Soom, A.; Ysebaert, M.-T.; Charlier, G.; Van Oostveldt, P.; de Kruif, A. Structural Aspects of the Zona Pellucida of In Vitro-Produced Bovine Embryos: A Scanning Electron and Confocal Laser Scanning Microscopic Study. *Biol. Reprod.* **2000**, *62*, 463–469. [CrossRef]
74. Pennetier, S.; Perreau, C.; Uzbekova, S.; Thélie, A.; Delaleu, B.; Mermillod, P.; Dalbiès-Tran, R. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC Dev. Biol.* **2006**, *6*, 26. [CrossRef]
75. Hou, J.; Liu, L.; Lei, T.; Cui, X.; An, X.; Chen, Y. Genomic DNA methylation patterns in bovine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization. *Sci. China Life Sci.* **2007**, *50*, 56–61. [CrossRef]
76. Wang, L.; Feng, H.; Ma, Y.; Cang, M.; Li, H.; Yan, Z.; Zhou, P.; Wen, J.; Bou, S.; Liu, D. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **2009**, *114*, 99–108. [CrossRef]
77. Kuijk, E.W.; van Tol, L.T.A.; Van de Velde, H.; Wubbolts, R.; Welling, M.; Geijsen, N.; Roelen, B.A.J. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* **2012**, *139*, 871–882. [CrossRef] [PubMed]
78. Madeja, Z.E.; Sosnowski, J.; Hryniewicz, K.; Warzych, E.; Pawlak, P.; Rozwadowska, N.; Plusa, B.; Lechniak, D. Changes in subcellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. *BMC Dev. Biol.* **2013**, *13*, 32. [CrossRef]
79. Simmet, K.; Zakhartchenko, V.; Philippou-Massier, J.; Blum, H.; Klymiuk, N.; Wolf, E. OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 2770–2775. [CrossRef] [PubMed]
80. Khan, D.R.; Dubé, D.; Gall, L.; Peynot, N.; Ruffini, S.; Laffont, L.; Le Bourhis, D.; Degrelle, S.; Jouneau, A.; Duranthon, V. Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: Ega and early lineage specification in the bovine embryo. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34110. [CrossRef] [PubMed]
81. Yao, T.; Suzuki, R.; Furuta, N.; Suzuki, Y.; Kabe, K.; Tokoro, M.; Sugawara, A.; Yajima, A.; Nagasawa, T.; Matoba, S.; et al. Live-cell imaging of nuclear–chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7460. [CrossRef] [PubMed]
82. Mesalam, A.; Lee, K.-L.; Khan, I.; Chowdhury, M.M.R.; Zhang, S.; Song, S.-H.; Joo, M.-D.; Lee, J.-H.; Jin, J.-I.; Kong, I.-K. A combination of bovine serum albumin with insulin–transferrin–sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture medium improves bovine embryo quality and trophoblast invasion by induction of matrix metalloproteinases. *Reprod. Fertil. Dev.* **2019**, *31*, 333–346. [CrossRef]
83. Monteiro, C.A.S.; Chow, D.J.; Leal, G.R.; Tan, T.C.; Ferreira, A.M.R.; Thompson, J.G.; Dunning, K.R. Optical imaging of cleavage stage bovine embryos using hyperspectral and confocal approaches reveals metabolic differences between on-time and fast-developing embryos. *Theriogenology* **2020**, *159*, 60–68. [CrossRef]
84. Squirrell, J.M.; Wokosin, D.L.; White, J.G.; Bavister, B.D. Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 763–767. [CrossRef]
85. Centonze, V.E.; White, J.G. Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2015–2024. [CrossRef]
86. You, S.; Tu, H.; Chaney, E.J.; Sun, Y.; Zhao, Y.; Bower, A.J.; Liu, Y.-Z.; Marjanovic, M.; Sinha, S.; Pu, Y.; et al. Intravital imaging by simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2125. [CrossRef]
87. Yadlowsky, M.J.; Schmitt, J.M.; Bonner, R.F. Multiple scattering in optical coherence microscopy. *Appl. Opt.* **1995**, *34*, 5699–5707. [CrossRef] [PubMed]
88. Rivenson, Y.; Ozcan, A. Deep learning accelerates whole slide imaging for next-generation digital pathology applications. *Light. Sci. Appl.* **2022**, *11*, 300. [CrossRef]
89. Welte, M.A. As the fat flies: The dynamic lipid droplets of Drosophila embryos. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851*, 1156–1185. [CrossRef] [PubMed]
90. Angel-Velez, D.; De Coster, T.; Azari-Dolatabad, N.; Fernández-Montoro, A.; Benedetti, C.; Pavani, K.; Van Soom, A.; Pascottini, O.B.; Smits, K. Embryo morphokinetics derived from fresh and vitrified bovine oocytes predict blastocyst development and nuclear abnormalities. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 4765. [CrossRef] [PubMed]
91. Magata, F. Time-lapse monitoring technologies for the selection of bovine in vitro fertilized embryos with high implantation potential. *J. Reprod. Dev.* **2023**, *69*, 57–64. [CrossRef]
92. Massip, A.; Mulnard, J. Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen--thawed cow blastocysts. *Reproduction* **1980**, *53*, 475–478. [CrossRef] [PubMed]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

93. Massip, A.; Mulnard, J.; Vanderzwalmen, P.; Hanzen, C.; Ectors, F. The behaviour of cow blastocyst in vitro: Cinematographic and morphometric analysis. *J. Anat.* **1982**, *134*, 399–405.
94. Sugimura, S.; Akai, T.; Hashiyada, Y.; Somfai, T.; Inaba, Y.; Hirayama, M.; Yamanouchi, T.; Matsuda, H.; Kobayashi, S.; Aikawa, Y.; et al. Promising System for Selecting Healthy In Vitro–Fertilized Embryos in Cattle. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36627. [CrossRef]
95. Sugimura, S.; Akai, T.; Imai, K. Selection of viable in vitro-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *J. Reprod. Dev.* **2017**, *63*, 353–357. [CrossRef]
96. Hardin, J. Confocal and Multi-Photon Imaging of Living Embryos. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*; Pawley, J.B., Ed.; Springer: Boston, MA, USA, 2006; pp. 746–768.
97. Holm, P.; Shukri, N.; Vajta, G.; Booth, P.; Bendixen, C.; Callesen, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology* **1998**, *50*, 1285–1299. [CrossRef]
98. Majerus, V.; Lequarré, A.S.; Ferguson, E.M.; Kaidi, S.; Massip, A.; Dessy, F.; Donnay, I. Characterization of embryos derived from calf oocytes: Kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. *Mol. Reprod. Dev.* **2000**, *57*, 346–352. [CrossRef] [PubMed]
99. Yoshioka, K.; Suzuki, C.; Iwamura, S. Effects of activin A and follistatin on developmental kinetics of bovine embryos: Cinematographic analysis in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* **2000**, *118*, 119–126. [CrossRef] [PubMed]
100. Peippo, J.; Kurkilahti, M.; Bredbacka, P. Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: The effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. *Zygote* **2001**, *9*, 105–113. [CrossRef] [PubMed]
101. Holm, P.; Booth, P.J.; Callesen, H. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* **2002**, *123*, 553–565. [CrossRef]
102. Lequarre, A.; Marchandise, J.; Moreau, B.; Massip, A.; Donnay, I. Cell Cycle Duration at the Time of Maternal Zygotic Transition for In Vitro Produced Bovine Embryos: Effect of Oxygen Tension and Transcription Inhibition. *Biol. Reprod.* **2003**, *69*, 1707–1713. [CrossRef]
103. Somfai, T.; Inaba, Y.; Aikawa, Y.; Ohtake, M.; Kobayashi, S.; Konishi, K.; Imai, K. Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. *J. Reprod. Dev.* **2010**, *56*, 200–207. [CrossRef]
104. Sugimura, S.; Akai, T.; Somfai, T.; Hirayama, M.; Aikawa, Y.; Ohtake, M.; Hattori, H.; Kobayashi, S.; Hashiyada, Y.; Konishi, K.; et al. Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: A novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biol. Reprod.* **2010**, *83*, 970–978. [CrossRef]
105. Magata, F.; Ideta, A.; Okubo, H.; Matsuda, F.; Urakawa, M.; Oono, Y. Growth potential of bovine embryos presenting abnormal cleavage observed through time lapse cinematography. *Theriogenology* **2019**, *133*, 119–124. [CrossRef]
106. Magata, F.; Urakawa, M.; Matsuda, F.; Oono, Y. Developmental kinetics and viability of bovine embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *Theriogenology* **2020**, *161*, 243–251. [CrossRef]
107. Suzuki, R.; Okada, M.; Nagai, H.; Kobayashi, J.; Sugimura, S. Morphokinetic analysis of pronuclei using time-lapse cinematography in bovine zygotes. *Theriogenology* **2021**, *166*, 55–63. [CrossRef]
108. Lechniak, D.; Sell-Kubiak, E.; Warzych, E. The metabolic profile of bovine blastocysts is affected by in vitro culture system and the pattern of first zygotic cleavage. *Theriogenology* **2022**, *188*, 43–51. [CrossRef]
109. Yaacobi-Artzi, S.; Kalo, D.; Roth, Z. Association between the morphokinetics of in-vitro-derived bovine embryos and the transcriptomic profile of the derived blastocysts. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0276642. [CrossRef] [PubMed]
110. Verlinsky, Y.; Pergament, E.; Strom, C. The preimplantation genetic diagnosis of genetic diseases. *J. Assist. Reprod. Genet.* **1990**, *7*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
111. Gardner, R.L.; Edwards, R.G. Control of the Sex Ratio at Full Term in the Rabbit by transferring Sexed Blastocysts. *Nature* **1968**, *218*, 346–348. [CrossRef] [PubMed]
112. Herr, C.; Reed, K. Micronanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* **1991**, *35*, 45–54. [CrossRef]
113. Leonard, M.; Kirszenbaum, M.; Cotinot, C.; Chesne, P.; Heyman, Y.; Stinnakre, M.; Bishop, C.; Delouis, C.; Vaiman, M.; Fellous, M. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. *Theriogenology* **1987**, *27*, 248. [CrossRef]
114. Bondioli, K.; Ellis, S.; Pryor, J.; Williams, M.; Harpold, M. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* **1989**, *31*, 95–104. [CrossRef]
115. Mullis, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* **1990**, *262*, 56–65. [CrossRef]
116. Machaty, Z.; Paldi, A.; Csaki, T.; Varga, Z.; Kiss, I.; Bárándi, Z.; Vajta, G. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *Reproduction* **1993**, *98*, 467–470. [CrossRef]
117. Park, J.; Lee, J.; Choi, K.; Joung, S.; Kim, J.; Chung, G.; Jin, D.; Im, K. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* **2001**, *55*, 1843–1853. [CrossRef]
118. Chrenek, P.; Boulanger, L.; Heyman, Y.; Uhrin, P.; Laurincik, J.; Bulla, J.; Renard, J.-P. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* **2001**, *55*, 1071–1081. [CrossRef] [PubMed]
119. Chen, C.M.; Hu, C.L.; Wang, C.H.; Hung, C.M.; Wu, H.K.; Choo, K.B.; Cheng, W.T.K. Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Mol. Reprod. Dev.* **1999**, *54*, 209–214. [CrossRef]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

120. Wrenzycki, C.; Herrmann, D.; Carnwath, J.W.; Niemann, H. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Reproduction* **1996**, *108*, 17–24. [CrossRef] [PubMed]
121. Vigneault, C.; McGraw, S.; Massicotte, L.; Sirard, M.-A. Transcription Factor Expression Patterns in Bovine In Vitro-Derived Embryos Prior to Maternal-Zygotic Transition. *Biol. Reprod.* **2004**, *70*, 1701–1709. [CrossRef] [PubMed]
122. Perez, V.M.N.; Zhang, Y.; Hansen, P.J. Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. *Reproduction* **2017**, *154*, 627–644. [CrossRef]
123. Mundim, T.; Ramos, A.; Sartori, R.; Dode, M.; Melo, E.; Gomes, L.; Rumpf, R.; Franco, M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. *Genet. Mol. Res.* **2009**, *8*, 1398–1407. [CrossRef] [PubMed]
124. Ponsart, C.; Le Bourhis, D.; Knijn, H.; Fritz, S.; Guyader-Joly, C.; Otter, T.; Lacaze, S.; Charreaux, F.; Schibler, L.; Dupassieux, D.; et al. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **2014**, *26*, 12–21. [CrossRef]
125. Mullaart, E.; Wells, D. Embryo biopsies for genomic selection. In *Animal Biotechnology 2: Emerging Breeding Technologies*; Springer: Berlin, Germany, 2018; pp. 81–94.
126. de Sousa, R.V.; Cardoso, C.R.D.S.; Butzke, G.; Dode, M.A.N.; Rumpf, R.; Franco, M.M. Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. *Theriogenology* **2017**, *90*, 25–31. [CrossRef]
127. Fisher, P.J.; Hyndman, D.L.; Bixley, M.J.; Oback, F.C.; Popovic, L.; McGowan, L.T.; Berg, M.C. Potential for genomic selection of bovine embryos. In Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production; New Zealand Society of Animal Production: Christchurch, New Zealand, 2012; pp. 156–158.
128. Reimand, J.; Isserlin, R.; Voisin, V.; Kucera, M.; Tannus-Lopes, C.; Rostamianfar, A.; Wadi, L.; Meyer, M.; Wong, J.; Xu, C.; et al. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 482–517. [CrossRef]
129. Pas, M.F.W.T.; van Hemert, S.; Hulsegge, B.; Hoekman, A.J.W.; Pool, M.H.; Rebel, J.M.J.; Smits, M.A. A pathway analysis tool for analyzing microarray data of species with low physiological information. *Adv. Bioinform.* **2008**, *2008*, 719468. [CrossRef]
130. Scott, B.; Haile-Mariam, M.; Cocks, B.; Pryce, J. How genomic selection has increased rates of genetic gain and inbreeding in the Australian national herd, genomic information nucleus, and bulls. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 11832–11849. [CrossRef]
131. Retallick, K.J.; Lu, D.; Garcia, A.; Miller, S.P. Genomic selection in the US: Where it has been and where it is going? In Proceedings of the 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), Rotterdam, The Netherland, 3–8 July 2022; pp. 1795–1798.
132. Silvestri, G.; Canedo-Ribeiro, C.; Serrano-Albal, M.; Labrecque, R.; Blondin, P.; Larmer, S.G.; Marras, G.; Tutt, D.A.; Handyside, A.H.; Farré, M.; et al. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Live Birth Rates with In Vitro Produced Bovine Embryos: A Blind Retrospective Study. *Cells* **2021**, *10*, 2284. [CrossRef]
133. Herrera, C. Clinical Applications of Preimplantation Genetic Testing in Equine, Bovine, and Human Embryos. *J. Equine Veter. Sci.* **2016**, *41*, 29–34. [CrossRef]
134. Saadi, H.A.S.; Vigneault, C.; Sargolzaei, M.; Gagné, D.; Fournier, É.; de Montera, B.; Chesnais, J.; Blondin, P.; Robert, C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 889. [CrossRef] [PubMed]
135. Turner, K.J.; Silvestri, G.; Black, D.H.; Dobson, G.; Smith, C.; Handyside, A.H.; Sinclair, K.D.; Griffin, D.K. Karyomapping for simultaneous genomic evaluation and aneuploidy screening of preimplantation bovine embryos: The first live-born calves. *Theriogenology* **2018**, *125*, 249–258. [CrossRef] [PubMed]
136. Tutt, D.; Silvestri, G.; Serrano-Albal, M.; Simmons, R.; Kwong, W.; Guven-Ates, G.; Canedo-Ribeiro, C.; Labrecque, R.; Blondin, P.; Handyside, A.; et al. Analysis of bovine blastocysts indicates ovarian stimulation does not induce chromosome errors, nor discordance between inner-cell mass and trophectoderm lineages. *Theriogenology* **2020**, *161*, 108–119. [CrossRef] [PubMed]
137. Bouwman, A.C.; Mullaart, E. Screening of in vitro-produced cattle embryos to assess incidence and characteristics of unbalanced chromosomal aberrations. *JDS Commun.* **2023**, *4*, 101–105. [CrossRef] [PubMed]
138. Masset, H.; Ding, J.; Dimitriadou, E.; Ardeshirdavani, A.; Debrock, S.; Tšuiko, O.; Smits, K.; Peeraer, K.; Moreau, Y.; Voet, T.; et al. Single-cell genome-wide concurrent haplotyping and copy-number profiling through genotyping-by-sequencing. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, e63. [CrossRef]
139. Griffin, D.K.; Jturner, K.; Silvestri, G.; Smith, C.; Dobson, G.; Black, D.H.; Sinclair, K.D.; Handyside, A.H. The use of Karyomapping for genomic evaluation and PGT-A of preimplantation cattle embryos: The first live-born calves. *Reprod. Biomed. Online* **2019**, *38*, e54–e55. [CrossRef]
140. Mohan, M.; Ryder, S.; Claypool, P.; Geisert, R.; Malayer, J. Analysis of Gene Expression in the Bovine Blastocyst Produced In Vitro Using Suppression-Subtractive Hybridization. *Biol. Reprod.* **2002**, *67*, 447–453. [CrossRef]
141. Mohan, M.; Hurst, A.; Malayer, J. Global gene expression analysis comparing bovine blastocysts flushed on day 7 or produced in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **2004**, *68*, 288–298. [CrossRef]
142. Corcoran, D.; Fair, T.; Rizos, D.; Smith, G.; Coussens, P.; Patel, O.; Ireland, J.; Boland, M.; Evans, A.; Lonergan, P. 216 Identification of Differentially Expressed Genes in Bovine Embryos Cultured In Vivo or In Vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **2005**, *17*, 259. [CrossRef]
143. Corcoran, D.; Fair, T.; Park, S.; Rizos, D.; Patel, O.V.; Smith, G.W.; Coussens, P.M.; Ireland, J.J.; Boland, M.P.; Evans, A.C.O.; et al. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* **2006**, *131*, 651–660. [CrossRef] [PubMed]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

144. Vallée, M.; Dufort, I.; Desrosiers, S.; Labbe, A.; Gravel, C.; Gilbert, I.; Robert, C.; Sirard, M.-A. Revealing the bovine embryo transcript profiles during early in vivo embryonic development. *Reproduction* **2009**, *138*, 95–105. [CrossRef] [PubMed]
145. El-Sayed, A.; Hoelker, M.; Rings, F.; Salilew, D.; Jennen, D.; Tholen, E.; Sirard, M.-A.; Schellander, K.; Tesfaye, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol. Genom.* **2006**, *28*, 84–96. [CrossRef]
146. Ghanem, N.; Wondim, D.S.; Gad, A.; Tesfaye, D.; Phatsara, C.; Tholen, E.; Looft, C.; Schellander, K.; Hoelker, M. Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction* **2011**, *142*, 551–564. [CrossRef]
147. Hoelker, M.; Rings, F.; Lund, Q.; Ghanem, N.; Phatsara, C.; Griese, J.; Schellander, K.; Tesfaye, D. Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured in vitro. *Reproduction* **2009**, *137*, 415–425. [CrossRef]
148. Kepková, K.V.; Vodicka, P.; Toralova, T.; Lopatarova, M.; Cech, S.; Dolezel, R.; Havlicek, V.; Besenfelder, U.; Kuzmany, A.; Sirard, M.A.; et al. Transcriptomic analysis of in vivo and in vitro produced bovine embryos revealed a developmental change in cullin 1 expression during maternal-to-embryonic transition. *Theriogenology* **2011**, *75*, 1582–1595. [CrossRef]
149. Labrecque, R.; Sirard, M.-A. Gene expression analysis of bovine blastocysts produced by parthenogenic activation or fertilisation. *Reprod. Fertil. Dev.* **2011**, *23*, 591–602. [CrossRef]
150. Sudano, M.J.; Caixeta, E.S.; Paschoal, D.M.; Rascado, T.S.; Crocomo, L.F.; Maziero, R.R.; Magalhães, L.C.O.; Guastali, M.D.; Vergara, L.E.; Monteiro, B.A.; et al. Microarray Analysis of In Vitro-Produced Bovine Embryos with Phenazine Ethosulfate. *Biol. Reprod.* **2012**, *87*, 215. [CrossRef]
151. Sudano, M.J.; Paschoal, D.M.; Caixeta, E.S.; Maziero, R.R.; Guastali, M.D.; Crocomo, L.F.; Rascado, T.S.; Magalhães, L.C.O.; Monteiro, B.A.; Martins, A.; et al. 82 Effect of High Fetal Calf Serum Concentration in the Gene Expression Pattern of In Vitro Produced Bovine Embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **2013**, *26*, 155. [CrossRef]
152. Misirlioglu, M.; Page, G.P.; Sagirkaya, H.; Kaya, A.; Parrish, J.J.; First, N.L.; Memili, E. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18905–18910. [CrossRef]
153. Kues, W.A.; Sudheer, S.; Herrmann, D.; Carnwath, J.W.; Havlicek, V.; Besenfelder, U.; Lehrach, H.; Adjaye, J.; Niemann, H. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19768–19773. [CrossRef]
154. Carter, F.; Rings, F.; Mamo, S.; Hölker, M.; Kuzmany, A.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Mehta, J.P.; Tesfaye, D.; Schellander, K.; et al. Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biol. Reprod.* **2010**, *83*, 707–719. [CrossRef] [PubMed]
155. Huang, W.; Yandell, B.S.; Khatib, H. Transcriptomic profiling of bovine IVF embryos revealed candidate genes and pathways involved in early embryonic development. *BMC Genom.* **2010**, *11*, 23. [CrossRef]
156. Bermejo-Alvarez, P.; Rizos, D.; Rath, D.; Lonergan, P.; Gutierrez-Adan, A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3394–3399. [CrossRef] [PubMed]
157. Salilew-Wondim, D.; Hölker, M.; Rings, F.; Ghanem, N.; Ulas-Cinar, M.; Peippo, J.; Tholen, E.; Looft, C.; Schellander, K.; Tesfaye, D. Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer. *Physiol. Genom.* **2010**, *42*, 201–218. [CrossRef]
158. Gad, A.; Besenfelder, U.; Rings, F.; Ghanem, N.; Salilew-Wondim, D.; Hossain, M.; Tesfaye, D.; Lonergan, P.; Becker, A.; Cinar, U.; et al. Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: Implications for animal breeding and human assisted reproduction. *Hum. Reprod.* **2011**, *26*, 1693–1707. [CrossRef]
159. Clemente, M.; Lopez-Vidriero, I.; O'Gaora, P.; Mehta, J.; Forde, N.; Gutierrez-Adan, A.; Lonergan, P.; Rizos, D. Transcriptome Changes at the Initiation of Elongation in the Bovine Conceptus. *Biol. Reprod.* **2011**, *85*, 285–295. [CrossRef] [PubMed]
160. Nagatomo, H.; Kagawa, S.; Kishi, Y.; Takuma, T.; Sada, A.; Yamanaka, K.-I.; Abe, Y.; Wada, Y.; Takahashi, M.; Kono, T.; et al. Transcriptional Wiring for Establishing Cell Lineage Specification at the Blastocyst Stage in Cattle. *Biol. Reprod.* **2013**, *88*, 158. [CrossRef] [PubMed]
161. Gad, A.; Hoelker, M.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Cinar, U.; Rings, F.; Held, E.; Dufort, I.; Sirard, M.A.; Schellander, K.; et al. Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and Their Regulation by Alternative In Vivo and In Vitro Culture Conditions. *Biol. Reprod.* **2012**, *87*, 100. [CrossRef] [PubMed]
162. Cagnone, G.; Dufort, I.; Vigneault, C.; Sirard, M.-A. Differential Gene Expression Profile in Bovine Blastocysts Resulting from Hyperglycemia Exposure During Early Cleavage Stages. *Biol. Reprod.* **2012**, *86*, 50. [CrossRef] [PubMed]
163. Cagnone, G.L.; Sirard, M.-A. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* **2013**, *80*, 297–314. [CrossRef] [PubMed]
164. Hosseini, S.M.; Dufort, I.; Caballero, J.; Moulavi, F.; Ghanaei, H.R.; Sirard, M.A. Transcriptome profiling of bovine inner cell mass and trophectoderm derived from in vivo generated blastocysts. *BMC Dev. Biol.* **2015**, *15*, 49. [CrossRef] [PubMed]
165. Desmet, K.L.J.; Van Hoeck, V.; Gagné, D.; Fournier, E.; Thakur, A.; O'doherty, A.M.; Walsh, C.P.; Sirard, M.A.; Bols, P.E.J.; Leroy, J.L.M.R. Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: Integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 1004. [CrossRef]

166. Gupta, A.; Singh, J.; Dufort, I.; Robert, C.; Dias, F.; Anzar, M. Transcriptomic difference in bovine blastocysts following vitrification and slow freezing at morula stage. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187268. [CrossRef]
167. Wu, C.; Blondin, P.; Vigneault, C.; Labrecque, R.; Sirard, M.-A. The age of the bull influences the transcriptome and epigenome of blastocysts produced by IVF. *Theriogenology* **2019**, *144*, 122–131. [CrossRef]
168. Salilew-Wondim, D.; Tesfaye, D.; Rings, F.; Held-Hoelker, E.; Miskel, D.; Sirard, M.-A.; Tholen, E.; Schellander, K.; Hoelker, M. The global gene expression outline of the bovine blastocyst: Reflector of environmental conditions and predictor of developmental capacity. *BMC Genom.* **2021**, *22*, 408. [CrossRef]
169. Hallberg, I.; Persson, S.; Olovsson, M.; Sirard, M.-A.; Damdimopoulou, P.; Rüegg, J.; Sjunnesson, Y.C. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure of bovine oocytes affects early embryonic development at human-relevant levels in an in vitro model. *Toxicology* **2021**, *464*, 153028. [CrossRef]
170. Rabaglino, M.B.; Salilew-Wondim, D.; Zolini, A.; Tesfaye, D.; Hoelker, M.; Lonergan, P.; Hansen, P.J. Machine-learning methods applied to integrated transcriptomic data from bovine blastocysts and elongating conceptuses to identify genes predictive of embryonic competence. *FASEB J.* **2023**, *37*, e22809. [CrossRef]
171. Brinkhof, B.; Van Tol, H.T.A.; Koerkamp, M.J.A.G.; Wubbolts, R.W.; Haagsman, H.P.; Roelen, B.A.J. Characterization of bovine embryos cultured under conditions appropriate for sustaining human naïve pluripotency. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172920. [CrossRef]
172. Ushizawa, K.; Herath, C.B.; Kaneyama, K.; Shiojima, S.; Hirasawa, A.; Takahashi, T.; Imai, K.; Ochiai, K.; Tokunaga, T.; Tsunoda, Y.; et al. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2004**, *2*, 77. [CrossRef]
173. Smith, S.L.; Everts, R.E.; Tian, X.C.; Du, F.; Sung, L.-Y.; Rodriguez-Zas, S.L.; Jeong, B.-S.; Renard, J.-P.; Lewin, H.A.; Yang, X. Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17582–17587. [CrossRef]
174. Pfister-Genskow, M.; Myers, C.; Childs, L.A.; Lacson, J.C.; Patterson, T.; Betthauser, J.M.; Goueleke, P.J.; Koppang, R.W.; Lange, G.; Fisher, P.; et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Individual Bovine Preimplantation Embryos Produced by Nuclear Transfer: Improper Reprogramming of Genes Required for Development. *Biol. Reprod.* **2005**, *72*, 546–555. [CrossRef]
175. Somers, J.; Smith, C.; Donnison, M.; Wells, D.; Henderson, H.; McLeay, L.; Pfeffer, P. Gene expression profiling of individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction* **2006**, *131*, 1073–1084. [CrossRef] [PubMed]
176. Wang, C.; Gong, B.; Bushel, P.R.; Thierry-Mieg, J.; Thierry-Mieg, D.; Xu, J.; Fang, H.; Hong, H.; Shen, J.; Su, Z.; et al. The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 926–932. [CrossRef] [PubMed]
177. Rao, M.S.; Van Vleet, T.R.; Ciurlionis, R.; Buck, W.R.; Mittelstadt, S.W.; Blomme, E.A.G.; Liguori, M.J. Comparison of RNA-Seq and Microarray Gene Expression Platforms for the Toxicogenomic Evaluation of Liver from Short-Term Rat Toxicity Studies. *Front. Genet.* **2019**, *9*, 636. [CrossRef] [PubMed]
178. Huang, W.; Khatib, H. Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq. *BMC Genom.* **2010**, *11*, 711. [CrossRef]
179. Mamo, S.; Mehta, J.P.; McGettigan, P.; Fair, T.; Spencer, T.E.; Bazer, F.W.; Lonergan, P. RNA Sequencing Reveals Novel Gene Clusters in Bovine Conceptuses Associated with Maternal Recognition of Pregnancy and Implantation. *Biol. Reprod.* **2011**, *85*, 1143–1151. [CrossRef]
180. Graf, A.; Krebs, S.; Zakhartchenko, V.; Schwalb, B.; Blum, H.; Wolf, E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4139–4144. [CrossRef]
181. Chitwood, J.L.; Rincon, G.; Kaiser, G.G.; Medrano, J.F.; Ross, P.J. RNA-seq analysis of single bovine blastocysts. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 350. [CrossRef] [PubMed]
182. Luo, L.; Shi, Y.; Wang, H.; Wang, Z.; Dang, Y.; Li, S.; Wang, S.; Zhang, K. Base editing in bovine embryos reveals a species-specific role of SOX2 in regulation of pluripotency. *PLoS Genet.* **2022**, *18*, e1010307. [CrossRef] [PubMed]
183. Zolini, A.M.; Block, J.; Rabaglino, M.B.; Rincon, G.; Hoelker, M.; Bromfield, J.J.; Salilew-Wondim, D.; Hansen, P.J. Genes associated with survival of female bovine blastocysts produced in vivo. *Cell Tissue Res.* **2020**, *382*, 665–678. [CrossRef]
184. Zolini, A.M.; Block, J.; Rabaglino, M.B.; Tríbulo, P.; Hoelker, M.; Rincon, G.; Bromfield, J.J.; Hansen, P.J. Molecular fingerprint of female bovine embryos produced in vitro with high competence to establish and maintain pregnancy†. *Biol. Reprod.* **2019**, *102*, 292–305. [CrossRef]
185. Nõmm, M.; Ivask, M.; Pärn, P.; Reimann, E.; Kõks, S.; Jaakma, Ü. Detecting Embryo Developmental Potential by Single Blastomere RNA-Seq. *Genes* **2023**, *14*, 569. [CrossRef] [PubMed]
186. Lavagi, I.; Krebs, S.; Simmet, K.; Beck, A.; Zakhartchenko, V.; Wolf, E.; Blum, H. Single-cell RNA sequencing reveals developmental heterogeneity of blastomeres during major genome activation in bovine embryos. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4071. [CrossRef] [PubMed]
187. Kropp, J.; Khatib, H. Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 6552–6563. [CrossRef]
188. Simmet, K.; Kurome, M.; Zakhartchenko, V.; Reichenbach, H.-D.; Springer, C.; Bähr, A.; Blum, H.; Philippou-Massier, J.; Wolf, E. The second lineage differentiation of bovine embryos fails in the absence of OCT4/POU5F. *bioRxiv* **2021**. [CrossRef]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

189. Zhao, X.-M.; Cui, L.-S.; Hao, H.-S.; Wang, H.-Y.; Zhao, S.-J.; Du, W.-H.; Wang, D.; Liu, Y.; Zhu, H.-B. Transcriptome analyses of inner cell mass and trophectoderm cells isolated by magnetic-activated cell sorting from bovine blastocysts using single cell RNA-seq. Reprod. *Domest. Anim.* **2016**, *51*, 726–735. [CrossRef]
190. Kropp, J.; Carrillo, J.A.; Namous, H.; Daniels, A.; Salih, S.M.; Song, J.; Khatib, H. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 280. [CrossRef]
191. Gilchrist, G.C.; Tscherner, A.; Nalpathamkalam, T.; Merico, D.; LaMarre, J. MicroRNA Expression during Bovine Oocyte Maturation and Fertilization. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 396. [CrossRef]
192. Tríbulo, P.; Rabaglino, M.B.; Bo, M.B.; Carvalheira, L.D.R.; Bishop, J.V.; Hansen, T.R.; Hansen, P.J. Dickkopf-related protein 1 is a progestomedin acting on the bovine embryo during the morula-to-blastocyst transition to program trophoblast elongation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11816. [CrossRef]
193. Diaz-Lundahl, S.; Sundaram, A.Y.; Gillund, P.; Gilfillan, G.D.; Olsaker, I.; Krogenæs, A. Gene Expression in Embryos From Norwegian Red Bulls With High or Low Non Return Rate: An RNA-Seq Study of in vivo-Produced Single Embryos. *Front. Genet.* **2022**, *12*, 780113. [CrossRef] [PubMed]
194. Halstead, M.M.; Ma, X.; Zhou, C.; Schultz, R.M.; Ross, P.J. Chromatin remodeling in bovine embryos indicates species-specific regulation of genome activation. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4654. [CrossRef] [PubMed]
195. Gross, N.; Strillacci, M.G.; Peñagaricano, F.; Khatib, H. Characterization and functional roles of paternal RNAs in 2–4 cell bovine embryos. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20347. [CrossRef] [PubMed]
196. Shi, Y.; Zhao, P.; Dang, Y.; Li, S.; Luo, L.; Hu, B.; Wang, S.; Wang, H.; Zhang, K. Functional roles of the chromatin remodeler SMARCA5 in mouse and bovine preimplantation embryos[†]. *Biol. Reprod.* **2021**, *105*, 359–370. [CrossRef]
197. Li, S.; Shi, Y.; Dang, Y.; Luo, L.; Hu, B.; Wang, S.; Wang, H.; Zhang, K. NOTCH signaling pathway is required for bovine early embryonic development. *Biol. Reprod.* **2021**, *105*, 332–344. [CrossRef]
198. Zhu, L.; Zhou, T.; Iyyappan, R.; Ming, H.; Dvoran, M.; Wang, Y.; Chen, Q.; Roberts, R.M.; Susor, A.; Jiang, Z. High-resolution ribosome profiling reveals translational selectivity for transcripts in bovine preimplantation embryo development. *Development* **2022**, *149*, dev.200819. [CrossRef]
199. Kajdasz, A.; Warzych, E.; Derebecka, N.; Madeja, Z.E.; Lechniak, D.; Wesoly, J.; Pawlak, P. Lipid Stores and Lipid Metabolism Associated Gene Expression in Porcine and Bovine Parthenogenetic Embryos Revealed by Fluorescent Staining and RNA-seq. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6488. [CrossRef]
200. Nix, J.L.; Schettini, G.P.; Biase, F.H. Sexing of cattle embryos using RNA-sequencing data or polymerase chain reaction based on a complete sequence of cattle chromosome Y. *Front. Genet.* **2023**, *14*, 569. [CrossRef]
201. Jiang, Z.; Sun, J.; Dong, H.; Luo, O.; Zheng, X.; Obergfell, C.; Tang, Y.; Bi, J.; O'neill, R.; Ruan, Y.; et al. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 756. [CrossRef]
202. Jiang, Z.; Dong, H.; Zheng, X.; Marjani, S.L.; Donovan, D.M.; Chen, J.; Tian, X. mRNA Levels of Imprinted Genes in Bovine In Vivo Oocytes, Embryos and Cross Species Comparisons with Humans, Mice and Pigs. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17898. [CrossRef] [PubMed]
203. Banliat, C.; Mahé, C.; Lavigne, R.; Com, E.; Pineau, C.; Labas, V.; Guyonnet, B.; Mermillod, P.; Saint-Dizier, M. Dynamic changes in the proteome of early bovine embryos developed in vivo. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 863700. [CrossRef]
204. Demant, M.; Deutsch, D.R.; Fröhlich, T.; Wolf, E.; Arnold, G.J. Proteome analysis of early lineage specification in bovine embryos. *Proteomics* **2014**, *15*, 688–701. [CrossRef] [PubMed]
205. Deutsch, D.R.; Fröhlich, T.; Otte, K.A.; Beck, A.; Habermann, F.A.; Wolf, E.; Arnold, G.J. Stage-Specific Proteome Signatures in Early Bovine Embryo Development. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 4363–4376. [CrossRef]
206. Banliat, C.; Mahé, C.; Lavigne, R.; Com, E.; Pineau, C.; Labas, V.; Guyonnet, B.; Mermillod, P.; Saint-Dizier, M. The proteomic analysis of bovine embryos developed in vivo or in vitro reveals the contribution of the maternal environment to early embryo. *BMC Genom.* **2022**, *23*, 839. [CrossRef]
207. Jensen, P.L.; Grøndahl, M.L.; Beck, H.C.; Petersen, J.; Stroebech, L.; Christensen, S.T.; Andersen, C.Y. Proteomic analysis of bovine blastocoel fluid and blastocyst cells. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2014**, *60*, 127–135. [CrossRef]
208. Jensen, P.L.; Beck, H.C.; Petersen, T.S.; Stroebech, L.; Schmidt, M.; Rasmussen, L.M.; Hyttel, P. Proteomic analysis of the early bovine yolk sac fluid and cells from the day 13 ovoid and elongated preimplantation embryos. *Theriogenology* **2014**, *82*, 657–667. [CrossRef] [PubMed]
209. Talbot, N.C.; Powell, A.M.; Caperna, T.J.; Garrett, W.M. Proteomic analysis of the major cellular proteins of bovine trophectoderm cell lines derived from IVP, parthenogenetic and nuclear transfer embryos: Reduced expression of annexins I and II in nuclear transfer-derived cell lines. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, *120*, 187–202. [CrossRef] [PubMed]
210. Raes, A.; Wydooghe, E.; Pavani, K.C.; Pascottini, O.B.; Van Steendam, K.; Dhaenens, M.; Boel, A.; Heras, S.; Heindryckx, B.; Peelman, L.; et al. Cathepsin-L Secreted by High-Quality Bovine Embryos Exerts an Embryotrophic Effect In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6563. [CrossRef]
211. Nel-Themaat, L.; Nagy, Z. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* **2011**, *32*, S257–S263. [CrossRef] [PubMed]
212. Rieger, D.; Guay, P. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. *Reproduction* **1988**, *83*, 585–591. [CrossRef] [PubMed]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

213. Thompson, J.G.; McNaughton, C.; Gasparrini, B.; McGowan, L.T.; Tervit, H.R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **2000**, *118*, 47–56. [CrossRef]
214. Leese, H.J. What does an embryo need? *Hum. Fertil.* **2003**, *6*, 180–185. [CrossRef] [PubMed]
215. Gardner, D.; Pawelczynski, M.; Trounson, A. Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* **1996**, *44*, 472–475. [CrossRef]
216. Partridge, R.; Leese, H. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **1996**, *8*, 945–950. [CrossRef]
217. Lopes, A.; Madsen, S.; Ramsing, N.; Løvendahl, P.; Greve, T.; Callesen, H. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum. Reprod.* **2006**, *22*, 558–566. [CrossRef]
218. Lopes, A.S.; Lane, M.; Thompson, J.G. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 2762–2773. [CrossRef]
219. Obeidat, Y.; Catandi, G.; Carnevale, E.; Chicco, A.J.; DeMann, A.; Field, S.; Chen, T. A multi-sensor system for measuring bovine embryo metabolism. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *126*, 615–623. [CrossRef]
220. Gómez, E.; Muñoz, M.; Simó, C.; Ibáñez, C.; Carrocera, S.; Martín-González, D.; Cifuentes, A. Non-invasive metabolomics for improved determination of embryonic sex markers in chemically defined culture medium. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1474*, 138–144. [CrossRef]
221. Gómez, E.; Carrocera, S.; Martin, D.; Herrero, P.; Canela, N.; Muñoz, M. Differential release of cell-signaling metabolites by male and female bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* **2018**, *114*, 180–184. [CrossRef] [PubMed]
222. Muñoz, M.; Uyar, A.; Correia, E.; Díez, C.; Fernandez-Gonzalez, A.; Caamaño, J.N.; Trigal, B.; Carrocera, S.; Seli, E.; Gomez, E. Non-invasive assessment of embryonic sex in cattle by metabolic fingerprinting of in vitro culture medium. *Metabolomics* **2014**, *10*, 443–451. [CrossRef]
223. dos Santos, É.; da Silva Martinho, H.; Annes, K.; da Silva, T.; Soares, C.; Leite, R.F.; Milazzotto, M. Raman-based noninvasive metabolic profile evaluation of in vitro bovine embryos. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21*, 075002. [CrossRef] [PubMed]
224. Rubessa, M.; Ambrosi, A.; Gonzalez-Pena, D.; Polkoff, K.M.; Wheeler, M.B. Non-invasive nuclear magnetic resonance analysis of male and female embryo metabolites during in vitro embryo culture. *Metabolomics* **2018**, *14*, 113. [CrossRef] [PubMed]
225. Perkel, K.J.; Madan, P. Spent culture medium analysis from individually cultured bovine embryos demonstrates metabolomic differences. *Zygote* **2017**, *25*, 662–674. [CrossRef]
226. Sturmey, R.; Bermejo-Alvarez, P.; Gutierrez-Adan, A.; Rizos, D.; Leese, H.; Lonergan, P. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: A biomarker of sex and viability. *Mol. Reprod. Dev.* **2010**, *77*, 285–296. [CrossRef]
227. Tiffin, G.J.; Rieger, D.; Betteridge, K.J.; Yadav, B.R.; King, W.A. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *Reproduction* **1991**, *93*, 125–132. [CrossRef]
228. Rieger, D.; Loskutoff, N.; Betteridge, K. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **1992**, *4*, 547–557. [CrossRef]
229. Donnay, I.; Leese, H. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.* **1999**, *53*, 171–178. [CrossRef]
230. Khurana, N.K.; Niemann, H. Energy Metabolism in Preimplantation Bovine Embryos Derived In Vitro or In Vivo. *Biol. Reprod.* **2000**, *62*, 847–856. [CrossRef]
231. Rubessa, M.; Ambrosi, A.; Gonzalez-Pena, D.; Polkoff, K.M.; Denmark, S.E.; Wheeler, M.B. Non-invasive analysis of bovine embryo metabolites during in vitro embryo culture using nuclear magnetic resonance. *AIMS Bioeng.* **2016**, *3*, 538–551. [CrossRef]
232. Steeves, T.; Gardner, D. Temporal and Differential Effects of Amino Acids on Bovine Embryo Development in Culture. *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 731–740. [CrossRef]
233. Nõmm, M.; Porosk, R.; Pärn, P.; Kilk, K.; Soomets, U.; Kõks, S.; Jaakma, Ü. In vitro culture and non-invasive metabolic profiling of single bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **2019**, *31*, 306. [CrossRef] [PubMed]
234. Ferguson, E.M.; Leese, H.J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* **2006**, *73*, 1195–1201. [CrossRef]
235. Sudano, M.J.; Rascado, T.D.; Tata, A.; Belaz, K.R.; Santos, V.G.; Valente, R.S.; Mesquita, F.S.; Ferreira, C.R.; Araújo, J.P.; Eberlin, M.N.; et al. Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology* **2016**, *86*, 472–484.e1. [CrossRef] [PubMed]
236. Kurosawa, H.; Utsunomiya, H.; Shiga, N.; Takahashi, A.; Ihara, M.; Ishibashi, M.; Nishimoto, M.; Watanabe, Z.; Abe, H.; Kumagai, J.; et al. Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption. *Hum. Reprod.* **2016**, *31*, 2321–2330. [CrossRef] [PubMed]
237. Asampille, G.; Cheredath, A.; Joseph, D.; Adiga, S.K.; Atreya, H.S. The utility of nuclear magnetic resonance spectroscopy in assisted reproduction. *Open Biol.* **2020**, *10*, 200092. [CrossRef]
238. Sivelli, G.; Conley, G.M.; Herrera, C.; Marable, K.; Rodriguez, K.J.; Bollwein, H.; Sudano, M.J.; Brugger, J.; Simpson, A.J.; Boero, G.; et al. NMR spectroscopy of a single mammalian early stage embryo. *J. Magn. Reson.* **2022**, *335*, 107142. [CrossRef]
239. Pomar, F.R.; Teerds, K.; Kidson, A.; Colenbrander, B.; Tharasanit, T.; Aguilar, B.; Roelen, B. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: A comparative study. *Theriogenology* **2005**, *63*, 2254–2268. [CrossRef]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

240. Sagirkaya, H.; Misirlioglu, M.; Kaya, A.; First, N.L.; Parrish, J.; Memili, E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* **2006**, *131*, 895–904. [CrossRef]
241. Ramos-Ibeas, P.; Gimeno, I.; Cañón-Beltrán, K.; Gutiérrez-Adán, A.; Rizos, D.; Gómez, E. Senescence and Apoptosis during in vitro Embryo Development in a Bovine Model. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 619902. [CrossRef] [PubMed]
242. Wondim, D.S.; Fournier, E.; Hoelker, M.; Saeed-Zidane, M.; Tholen, E.; Looft, C.; Neuhoff, C.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Rings, F.; et al. Genome-Wide DNA Methylation Patterns of Bovine Blastocysts Developed In Vivo from Embryos Completed Different Stages of Development In Vitro. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140467. [CrossRef]
243. Dobbs, K.B.; Rodriguez, M.; Sudano, M.J.; Ortega, M.S.; Hansen, P.J. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66230. [CrossRef] [PubMed]
244. Morin-Doré, L.; Blondin, P.; Vigneault, C.; Grand, F.; Labrecque, R.; Sirard, M. DNA methylation status of bovine blastocysts obtained from peripubertal oocyte donors. *Mol. Reprod. Dev.* **2020**, *87*, 910–924. [CrossRef] [PubMed]
245. Laskowski, D.; Humblot, P.; Sirard, M.-A.; Sjunnesson, Y.; Jhamat, N.; Båge, R.; Andersson, G. DNA methylation pattern of bovine blastocysts associated with hyperinsulinemia in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **2018**, *85*, 599–611. [CrossRef]
246. Salilew-Wondim, D.; Saeed-Zidane, M.; Hoelker, M.; Gebremedhn, S.; Poirier, M.; Pandey, H.O.; Tholen, E.; Neuhoff, C.; Held, E.; Besenfelder, U.; et al. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture before, during or after embryonic genome activation. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 424. [CrossRef]
247. Duan, J.E.; Jiang, Z.C.; Alqahtani, F.; Mandoiu, I.; Dong, H.; Zheng, X.; Marjani, S.L.; Chen, J.; Tian, X.C. Methylome Dynamics of Bovine Gametes and in vivo Early Embryos. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 512. [CrossRef]
248. Ming, H.; Sun, J.; Pasquariello, R.; Gatenby, L.; Herrick, J.R.; Yuan, Y.; Pinto, C.R.; Bondioli, K.R.; Krisher, R.L.; Jiang, Z. The landscape of accessible chromatin in bovine oocytes and early embryos. *Epigenetics* **2020**, *16*, 300–312. [CrossRef]
249. Kurosaka, S.; Eckardt, S.; McLaughlin, K.J. Pluripotent Lineage Definition in Bovine Embryos by Oct4 Transcript Localization. *Biol. Reprod.* **2004**, *71*, 1578–1582. [CrossRef]
250. Hyttel, P.; Viuff, D.; Laurincik, J.; Schmidt, M.; Thomsen, P.; Avery, B.; Callesen, H.; Rath, D.; Niemann, H.; Rosenkranz, H.; et al. Risks of in-vitro production of cattle and swine embryos: Aberrations in chromosome numbers, ribosomal RNA gene activation and perinatal physiology. *Hum. Reprod.* **2000**, *15*, 87–97. [CrossRef]
251. Demyda-Peyrás, S.; Dorado, J.; Hidalgo, M.; Anter, J.; De Luca, L.; Genero, E.R.; Moreno-Millán, M. Effects of oocyte quality, incubation time and maturation environment on the number of chromosomal abnormalities in IVF-derived early bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **2013**, *25*, 1077–1084. [CrossRef]
252. Guilherme, V.B.; Pronunciate, M.; dos Santos, P.H.; Ciniciato, D.D.S.; Takahashi, M.B.; Rocha, J.C.; Nogueira, M.F.G. Distinct Sources of a Bovine Blastocyst Digital Image Do not Produce the Same Classification by a Previously Trained Software Using Artificial Neural Network. *bioRxiv* **2018**, 424028. [CrossRef]
253. Rocha, J.C.; Passalia, F.J.; Matos, F.D.; Takahashi, M.B.; Ciniciato, D.D.S.; Maserati, M.P.; Alves, M.F.; de Almeida, T.G.; Cardoso, B.L.; Basso, A.C.; et al. A method based on artificial intelligence to fully automatize the evaluation of bovine blastocyst images. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7659. [CrossRef]
254. Melo, D.H.; Nascimento, M.Z.; Oliveira, D.L.; Neves, L.A.; Annes, K. Algorithms for automatic segmentation of bovine embryos produced in vitro. *J. Phys. Conf. Ser.* **2014**, *490*, 012125. [CrossRef]
255. Ciniciato, D.D.S.; Takahashi, M.B.; Nogueira, M.F.G.; Rocha, J.C. Potential Use of Smartphone as a Tool to Capture Embryo Digital Images from Stereomicroscope and to Evaluate Them by an Artificial Neural Network. In Proceedings of the International Conference on Computer-Human Interaction Research and Applications, Funchal, Portugal, 31 October–2 November 2017; pp. 185–189. [CrossRef]
256. Nogueira, M.F.G.; Guilherme, V.B.; Pronunciate, M.; Dos Santos, P.H.; da Silva, D.L.B.; Rocha, J.C. Artificial Intelligence-Based Grading Quality of Bovine Blastocyst Digital Images: Direct Capture with Juxtaposed Lenses of Smartphone Camera and Stereomicroscope Ocular Lens. *Sensors* **2018**, *18*, 4440. [CrossRef]
257. Workman, A.M.; Heaton, M.P.; Ley, B.L.V.; Webster, D.A.; Sherry, L.; Larson, S.; Kalbfleisch, T.S.; Harhay, G.P.; Jobman, E.E.; Carlson, D.F.; et al. First gene-edited calf with reduced susceptibility to a major viral pathogen. *bioRxiv* **2022**. [CrossRef] [PubMed]
258. Mellisho, E.; Briones, M.A.; Velasquez, A.E.; Cabezas, J.; Castro, F.O.; Rodriguez-Alvarez, L. Extracellular vesicles secreted during blastulation show viability of bovine embryos. *Reproduction* **2019**, *158*, 477–492. [CrossRef] [PubMed]
259. Mellisho, E.A.; Velásquez, A.E.; Nuñez, M.J.; Cabezas, J.G.; Cueto, J.A.; Fader, C.; Castro, F.O.; Rodríguez-Álvarez, L. Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178306. [CrossRef]
260. Saadeldin, I.M.; Kim, S.J.; Bin Choi, Y.; Lee, B.C. Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: A possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. *Cell. Reprogram.* **2014**, *16*, 223–234. [CrossRef] [PubMed]
261. Rabaglino, M.B.; O'doherty, A.; Secher, J.B.-M.; Lonergan, P.; Hyttel, P.; Fair, T.; Kadarmideen, H.N. Application of multi-omics data integration and machine learning approaches to identify epigenetic and transcriptomic differences between in vitro and in vivo produced bovine embryos. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0252096. [CrossRef]
262. Milazzotto, M.P.; Noonan, M.J.; Ferraz, M.D.A.M.M. Mining RNAseq data reveals dynamic metaboloepigenetic profiles in human, mouse and bovine pre-implantation embryos. *iScience* **2022**, *25*, 103904. [CrossRef] [PubMed]
263. Dochi, O. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. *J. Reprod. Dev.* **2019**, *65*, 389–396. [CrossRef] [PubMed]

264. Banik, S.; Melanthota, S.K.; Arbaaz; Vaz, J.M.; Kadambalithaya, V.M.; Hussain, I.; Dutta, S.; Mazumder, N. Recent trends in smartphone-based detection for biomedical applications: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413*, 2389–2406. [CrossRef] [PubMed]
265. Freeman, K.; Dinnes, J.; Chuchu, N.; Takwoingi, Y.; Bayliss, S.E.; Matin, R.N.; Jain, A.; Walter, F.M.; Williams, H.C.; Deeks, J.J. Algorithm based smartphone apps to assess risk of skin cancer in adults: Systematic review of diagnostic accuracy studies. *BMJ* **2020**, *368*, m127. [CrossRef] [PubMed]
266. Patil, S.K.; Nair, M.R.; Manjunath, A.; Mujib, B.R.A. Evaluation and comparison between smartphone and photomicrography based whole slide imaging. *J. Fam. Med. Prim. Care* **2020**, *9*, 2319–2323. [CrossRef]
267. Russ, J.C.; Matey, J.R.; Mallinckrodt, A.J.; McKay, S. The Image Processing Handbook. *Comput. Phys.* **1994**, *8*, 177–178. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

J. Dairy Sci. 106:4380–4396
https://doi.org/10.3168/jds.2022-22736
© 2023, The Authors. Published by Elsevier Inc. and Fass Inc. on behalf of the American Dairy Science Association®.
This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Comparison of cattle derived from in vitro fertilization, multiple ovulation embryo transfer, and artificial insemination for milk production and fertility traits

Simon Lafontaine,[1] Rémi Labrecque,[2] Patrick Blondin,[2] Roger I. Cue,[3] and Marc-André Sirard[1]*
[1]Centre de recherche en reproduction, développement et santé intergénérationnelle (CRDSI), Département des Sciences Animales, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec, QC G1K 7P4, Canada
[2]SEMEX Boviteq, 3450 Rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada
[3]Department of Animal Science, McGill University, Montréal, QC H9X 3V9, Canada

ABSTRACT

The use of assisted-reproduction technologies such as in vitro fertilization (IVF) is increasing, particularly in dairy cattle. The question of consequences in later life has not yet been directly addressed by studies on large animal populations. Studies on rodents and early data from humans and cattle suggest that in vitro manipulation of gametes and embryos could result in long-term alteration of metabolism, growth, and fertility. Our goal was to better describe these presumed consequences in the population of dairy cows produced by IVF in Québec (Canada) and to compare them to animals conceived by artificial insemination (AI) or multiple ovulation embryo transfer (MOET). To do so, we leveraged a large phenotypic database (2.5 million animals and 4.5 million lactations) from milk records in Québec aggregated by Lactanet (Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) and spanning 2012 to 2019. We identified 304,163, 12,993, and 732 cows conceived by AI, MOET, and IVF, respectively, for a total of 317,888 Holstein animals from which we retrieved information for 576,448, 24,192, and 1,299 lactations (total = 601,939), respectively. Genetic energy-corrected milk yield (GECM) and Lifetime Performance Index (LPI) of the parents of cows were used to normalize for genetic potential across animals. When compared with the general Holstein population, MOET and IVF cows outperformed AI cows. However, when comparing those same MOET and IVF cows with only herdmates and accounting for their higher GECM in the models, we found no statistical difference between the conception methods for milk production across the first 3 lactations. We also found that the rate of Lifetime Performance Index improvement of the IVF population during the 2012 to 2019 period was less than the rate observed in the AI population. Fertility analysis revealed that MOET and IVF cows also scored 1 point lower than their parents on the daughter fertility index and had a longer interval from first service to conception, with an average of 35.52 d compared with 32.45 for MOET and 31.87 for AI animals. These results highlight the challenges of elite genetic improvement while attesting to the progress the industry has made in minimizing epigenetic disturbance during embryo production. Nonetheless, additional work is required to ensure that IVF animals can maintain their performance and fertility potential.

Key words: bovine, IVF, ART, phenotypes, epigenetics

INTRODUCTION

In vitro production of bovine embryos has gained a predominant role in dairy genetic improvement in the last decade (IETS, 2020), owing to the significant generation interval reduction and increased female selective pressure obtained by the convergence of genomic selection, ovarian stimulation, ultrasound-guided transvaginal ovum pickup, in vitro maturation, in vitro fertilization (**IVF**), and in vitro embryo culture up to the blastocyst stage. These assisted-reproduction technologies (**ART**) make it possible for a heifer to produce multiple living offspring only a few months after her first estrous cycle. Multiple ovulation embryo transfer (**MOET**) can be performed every 6 to 8 wk. On the other hand, ovum pickup can be performed safely every 2 wk, further increasing the number of embryos produced per oocyte donor in in vitro production programs (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006; Sirard et al., 2018).

However, epigenetic changes in gametes, embryos, conceptus, and newborns linked to ART-related alterations in the peri-conceptional conditions have been documented in several mammalian species. In humans, studies on placenta and cord blood revealed progressive dysregulation of DNA methylation and histone modification with increasingly invasive fertility interventions,

Received September 6, 2022.
Accepted December 19, 2022.
*Corresponding author: marc-andre.sirard@fsaa.ulaval.ca

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

such as in vitro production, combined with intracytoplasmic sperm injection or a freeze-thaw cycle (Choux et al., 2018; Choufani et al., 2019; Chen et al., 2020; Caramaschi et al., 2021). Though initially focused on disorders related to imprinted genes (Young et al., 2001; Farin et al., 2006; Grace and Sinclair, 2009; Chen et al., 2013; Lafontaine et al., 2020), the molecular epigenetic effects of in vitro manipulation of gametes and embryos was also documented in the bovine model at the gamete and embryonic level (reviewed in Urrego et al., 2014; Wu and Sirard, 2020).

Mostly in humans and mice, multiple studies have reported on the long-term effect of ART (Chen and Heilbronn, 2017). For example, children from IVF presented higher systolic and diastolic blood pressure compared with their naturally conceived counterparts (Ceelen et al., 2008; Valenzuela-Alcaraz et al., 2013; Zandstra et al., 2020), as well as glucose metabolism impairment (Ceelen et al., 2008; Gkourogianni et al., 2014). However, it is important to mention that the effects of ART do not seem systematic but rather limited to a population of outliers, alluding to the fact that most individuals or animals are either unaffected by or compensate somehow for the adverse periconceptual conditions (Choufani et al., 2019). This is illustrated by some cohort studies noting either no adverse health outcomes later in life (Halliday et al., 2019), or transient effects resolved in early postnatal development or childhood (Novakovic et al., 2019). Differences in blood DNA methylation were also reported to disappear by adulthood (Penova-Veselinovic et al., 2021). Available literature on the long-term effects of ART in cattle remains surprisingly sparse considering the intense phenotyping taking place in the dairy industry. Indeed, conventional and new high-throughput phenotyping has led to the accumulation of large amounts of data on individual animals and herds, and the advent of livestock "big data" (Koltes et al., 2019; Cole et al., 2020), opening the door for high precision retrospective longitudinal cohort studies. Rare examples at the herd level include Siqueira et al. (2017, 2019), where records from 1,252 calves and 831 cows were analyzed. The study concluded that IVF calves had higher birth weights and that cows derived from reverse X-sorted semen-IVF had lower milk yields in their first lactation. Similar findings of IVF calves being heavier at birth than AI counterparts (Rérat et al., 2005) and embryo transfer (**ET**) calves being heavier than AI calves (Wilson et al., 1995) were also previously reported. Although studies by Bonilla et al. (2014) found no birth weight difference between ET and AI, and Viziack (2020) and Baruselli et al. (2021) found no differences in birth weight and milk production associated with ART as noted in Siqueira et al. (2017), ET and IVF calves from nulliparous recipients had lower birth and weaning weights and lower milk production. Because of this common recipient factor between ET and IVF, an experimental design comparing ET versus IVF versus AI can effectively eliminate the variation induced by recipients from the AI-IVF contrast, allowing a more specific characterization of outcomes related to in vitro manipulations.

To further describe the long-term consequences of ART in cattle, we surveyed Lactanet's database from which we obtained the records of several hundreds of IVF animals in conjunction with tens of thousands of ET and hundreds of thousands AI animals, each with detailed EBV and up to 3 recorded lactations. Our analysis focused on milk production and reproductive performance at the population level, hence multiple analytical methods were used to correct for management and other environmental factors to increase the representativity of the results.

MATERIALS AND METHODS

Data

No human or animal subjects were used, so this analysis did not require approval by an Institutional Animal Care and Use Committee or Institutional Review Board. A retrospective cohort study was conducted using the DHI data set provided by Lactanet Inc. (Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada), which contains information about Québec's enrolled herds of Holstein cows that had at least 1 lactation between 2012 and 2019. Lactanet's data were provided in the following 2 separate files: the animal file and the lactation file. The animal file contained, among others, the internal animal identification number, the animal herdbook registration number, as well as the dam and sire registration numbers. The lactation file contained milk production and lactation-related variables such as lactation number, lactation start and end dates, and total lactation milk, fat, and protein yields. The original data set contained 2,506,575 animal records and 4,096,899 lactation records.

The attribution of the ART conception method (IVF, MOET) was made possible by using records from Holstein Canada (Brantford, ON, Canada) and merging them to the Lactanet's animal file with the animal registration number.

The EBV were also provided by Lactanet. Cow EBVs were extracted on March 3, 2021, and contained 725,543 records, whereas bull EBVs were taken from the April 2021 proof run (https://www.cdn.ca/files_ge_datafiles.php?year=2021&month=04) and contained 15,585 records.

Table 1. Animals and lactations available for production models

	All herds				IVF herds			
	Animals		Lactations		Animals		Lactations	
Conception method[1]	n	%	n	%	n	%	n	%
AI	304,163	95.68	576,448	95.77	16,905	79.66	31,437	80.29
Embryo transfer (MOET)	12,993	4.09	24,192	4.02	3,585	16.89	6,418	16.39
IVF	732	0.23	1,299	0.22	732	3.45	1,299	3.32

[1]MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

The analyses regarding production (ECM), genetic potential (Lifetime Performance Index, **LPI**), and fertility (daughter fertility, **DF**) were conducted on 2 different data sets based on herds included. The "all herds" data set contained all animals or lactations irrespective of the herd of origin. In contrast, the "IVF herds" data set included animals or lactations only from herds that contained at least 1 IVF animal during the 2012 to 2019 period.

Data processing, visualization, and statistical analysis were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc.). While testing mixed linear models, the fixed effects were added to the models one by one and checked for statistical significance using the type III sum of squares test. Likewise, random effects were added to the model one by one. After a new random effect was added to a model, the Bayesian information criterion value was compared with the model without that random effect. The random effect was judged statistically significant if its inclusion decreased the Bayesian information criterion value by 8 or more.

Least squares means, confidence limits, and multiple comparisons were computed using the LSMEANS statement. Unless stated otherwise, P-values for multiple comparisons were corrected using the Bonferroni method.

Production

Animals (from the data sets mentioned above) were included in the analysis if milk, fat, and protein yields, as well as breeding values of both dam and sire, were available. For these animals, we limited our analysis to the first 3 lactations because of the progressively smaller number of available lactations for many animals, especially IVF animals (Supplemental Figure S1; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). To avoid potential truncation effects, we removed lactations starting in 2019, thereby allowing all animals the opportunity to have complete lactations. Additionally, lactations lasting less than 180 d were deemed incomplete and removed from the data set. Finally, to avoid potential outliers, we removed lactations with either milk, fat, or protein yields above the 99th percentile or below the 1st percentile. Final animal and lactation numbers used for analysis are displayed in Table 1.

The ECM yield for each lactation was computed as follows using equation 1 (Jamrozik et al., 2020):

$$\text{ECM (kg)} = 0.25 \times \text{milk (kg)} + 12.2 \times \text{fat (kg)} + 7.7 \times \text{protein (kg)}. \quad [1]$$

Similarly, the genetic ECM (**GECM**) EBV of dams and sires were computed as follows using the same coefficients on milk, fat, and protein yield EBVs (equation 2):

$$\text{GECM (kg)} = 0.25 \times \text{milk EBV (kg)} + 12.2 \times \text{fat EBV (kg)} + 7.7 \times \text{protein EBV (kg)}. \quad [2]$$

The effect of each conception method on the lactation ECM yield was analyzed using the high-performance mixed procedure (HPMIXED) of SAS version 9.4 (SAS Institute Inc.). For both "all herds" and "IVF herds," we used the following model, as described by equation 3:

$$Y_{ijklmno} = \mu + conception_i + b_1 sireGECM_j + b_2 damGECM_k + lactNo_l + conception_i \times lactNo_l + lactyear_m + hrd_n \times conception_i + lactyear_m \times hrd_n + cow_{ino} + e_{ijklmno}, \quad [3]$$

where $Y_{ijklmno}$ is the lactation ECM yield (kg); μ is the overall mean effect; $conception_i$ is the fixed effect of the ith method used to conceived that animal (i = AI, MOET, IVF); b_1 is the regression coefficient of Y on sire GECM ($sireGECM_j$); $sireGECM_j$ is the recorded value of the jth sire; b_2 is the regression coefficient of Y on dam GECM ($damGECM_k$); $damGECM_k$ is the recorded value of the kth dam; $lactNo_l$ is the fixed effect of the lactation number (parity) of the cow (l = 1, 2, 3);

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

$conception_i \times lactNo_l$ is the fixed effect of the interaction of the ith conception method with the lth lactation number; $lactyear_m$ is the random effect of the mth lactationyear(m=2012,. . .,2018),$lactyear_m \sim N\left(0, \sigma^2_{lactyear}\right)$; $hrd_n \times conception_i$ is the random interaction of the nth herd with the ith conception method, $hrd_n \times conception_i \sim N\left(0, \sigma^2_{hrd\times conception}\right)$; $lactyear_m \times hrd_n$ is the random interaction of the mth lactation year with the nth herd, $lactyear_m \times hrd_n \sim N\left(0, \sigma^2_{lactyear\times hrd}\right)$; cow_{ino} is the random effect of the oth cow from the ith conception of the nth herd, $cow_{ino} \sim N\left(0, \sigma^2_{cow}\right)$; $e_{ijklmno}$ is the random residual, $e_{ijklmno} \sim N\left(0, \sigma^2_e\right)$.

Lifetime Performance Index

We used the LPI (CDN, 2022) to compare the genetic potential of the daughter to that of her parents. Although, direct comparison or conversion with other Canadian or international selection indices are not possible, their composition informs us of their respective underlying breeding philosophy. As of April 2022, the Holstein LPI gives a 40% weight to production traits, 40% to durability traits, and 20% to health and fertility traits. For comparison, the American Total Performance Index attributes a 46% weight on production, 26% on conformation, and 28% on health and fertility (https://www.holsteinusa.com/genetic_evaluations/ss_tpi_formula.html).

We relied solely on animals (daughters) with a complete genetic evaluation and with parents' data also available. This restricted the number of animals as shown in Table 2. We analyzed the difference between a daughter's LPI and her parent average (**PA**) LPI (*LPI_Dif*; equation 4) as follows:

$$LPI_Dif = Daughter\,LPI - \frac{sire\,LPI + dam\,LPI}{2}. \quad [4]$$

The impact of each conception method on the intergenerational LPI difference was analyzed using the mixed procedure (MIXED) of SAS version 9.4. For both "all herds" and "IVF herds" we used the following model, as described by equation 5:

$$Y_{ijkl} = \mu + conception_i + b_1 birthdate_j + b_2 PALPI_k + hrd_l \times conception_i + e_{ijkl}, \quad [5]$$

where Y_{ijkl} is the LPI difference; μ is the overall mean effect; $conception_i$ is the fixed effect of the ith method used to conceived that daughter (i = AI, MOET, IVF); b_1 is the regression coefficient of Y on the daughter birth date ($birthdate_j$); $birthdate_j$ is the recorded birth date of the jth daughter; b_2 is the regression coefficient of Y on the PA LPI ($PALPI_k$); $PALPI_k$ is the measured value of the kth parents; $hrd_l \times conception_i$ is the random interaction of the lth herd with the ith conception method, $hrd_l \times conception_i \sim N\left(0, \sigma^2_{hrd\times conception}\right)$; e_{ijkl} is the random residual, $e_{ijkl} \sim N\left(0, \sigma^2_e\right)$.

Estimates of the yearly LPI means by conception method were computed using ESTIMATE statements.

Table 2. Animals available for Lifetime Performance Index models

	All herds		IVF herds	
Conception method[1]	n	%	n	%
AI	373,528	95.45	29,098	81.90
Embryo transfer (MOET)	16,926	4.33	5,549	15.62
IVF	882	0.23	882	2.48

[1]MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

Daughter Fertility

A similar analysis to LPI was performed on the DF subindex. This index is composed of multiple traits, all aiming at minimizing the time taken for a heifer or a cow to achieve reproductive cycle milestones. A detailed composition and weight for each trait can be found in Table 3.

Again, animals included for analysis had both a direct and a parent DF average value available (Table 4). The DF difference between a daughter and her parents (*DF_Dif*) was calculated by subtracting the arithmetic mean of the DF values of parents from the daughter's own DF value (equation 6) as follows:

$$DF_Dif = Daughter\,DF - \frac{sire\,DF + dam\,DF}{2}. \quad [6]$$

The impact of each conception method on the intergenerational DF difference was analyzed using the mixed procedure (MIXED) of SAS version 9.4. For both all

Table 3. Daughter fertility index composition

Trait	Weight (%)
Age at first service for heifers	11
Nonreturn rate to 56 d for heifers	16
First service to conception for heifers	8
Interval from calving to first service	15
Nonreturn rate to 56 d for cows	34
First service to conception for cows	16

Table 4. Animals available for daughter fertility models

	All herds		IVF herds	
Conception method[1]	n	%	n	%
AI	364,670	95.60	26,555	82.31
Embryo transfer (MOET)	16,070	4.21	4,981	15.44
IVF	728	0.19	728	2.26

[1]MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

herds and IVF herds, we used the following model, as described by equation 7:

$$Y_{ijkl} = \mu + conception_i + b_1 birthdate_j + b_2 PADF_k + hrd_l \times conception_i + e_{ijkl}, \quad [7]$$

where Y_{ijkl} is the DF difference; μ is the overall mean effect; $conception_i$ is the fixed effect of the ith method used to conceived that animal (i = AI, MOET, IVF); b_1 is the regression coefficient of Y on the daughter birth date ($birthdate_j$); $birthdate_j$ is the recorded birth date of the jth daughter; b_2 is the regression coefficient of Y on the PA DF ($PADF_k$); $PADF_k$ is the measured value of the kth parents; $hrd_l \times conception_i$ is the random interaction of the lth herd with the ith conception method, $hrd_n \times conception_i \sim N\left(0, \sigma^2_{hrd\times conception}\right)$; e_{ijkl} is the random residual, $e_{ijkl} \sim N\left(0, \sigma^2_e\right)$.

Interval from First Service to Conception

We observed the interval from first service to conception in relationship with the method used to conceive the cow. Compared with other reproductive interval metrics (days open, calving interval, and so on), this interval has the benefit of excluding management related bias such as a voluntary waiting period after calving, hence, allowing us to better discern biological reasons for reproductive performance.

The number of reproductive cycles with available information for this variable is shown in Table 5. Due to the large number of "0" values (conception happening at the first service) and the positive skew of the distribution, we relied on the Kruskal-Wallis nonparametric test and the Dwass, Steel, Critchlow-Flinger method for the pairwise comparisons included in the SAS procedure NPAR1WAY.

Age at First Service

The age at first service is a trait included in the DF subindex (Table 3). The number of animals with available information can be found in Table 6.

The effect of each conception method on the intergenerational age at first service was analyzed using the mixed procedure (MIXED) of SAS version 9.4. For the "all herds" and "IVF-herds" data sets, we used the following model, as described by equation 8:

$$Y_{ijkl} = \mu + conception_i + b_1 birthdate_j + b_2 PADF_k + hrd_l \times conception_i + e_{ijkl}, \quad [8]$$

where Y_{ijkl} is the age at first service; μ is the overall mean effect; $conception_i$ is the fixed effect of the ith method used to conceived that animal (i = AI, MOET, IVF); b_1 is the regression coefficient of Y on the daughter birth date ($birthdate_j$); $birthdate_j$ is the recorded birth date of the jth daughter; b_2 is the regression coefficient of Y on the PA DF ($PADF_k$); $PADF_k$ is the measured value of the kth parents; $hrd_l \times conception_i$ is the random interaction of the lth herd with the ith conception method, $hrd_n \times conception_i \sim N\left(0, \sigma^2_{hrd\times conception}\right)$; e_{ijkl} is the random residual, $e_{ijkl} \sim N\left(0, \sigma^2_e\right)$.

Table 5. Interval from first service to conception

	All herds			IVF herds		
Conception method[1]	n	Mean (day)	SD	n	Mean (d)	SD
AI	850,884	32.45[a]	45.05	51,052	31.89[a]	44.76
Embryo transfer (MOET)	32,271	31.87[a]	44.45	8,390	31.08[a]	44.33
IVF	1,014	35.52[b]	46.06	1,014	35.52[b]	46.06

[a,b]Means with different superscripts in the same column differ with $P < 0.01$ (a $\neq$ b).

[1]MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 6. Age at first service

	All herds			IVF herds		
Conception method[1]	n	LSM (d)	SE	n	LSM (d)	SE
AI	283,738	469.51[b]	0.5183	13,805	460.52[a]	2.3480
Embryo transfer (MOET)	11,011	462.74[a]	1.0329	2,489	457.71[a]	2.6475
IVF	324	459.58[a]	3.7457	324	457.32[a]	3.4755

[a,b]Means with different superscripts in the same column differ with $P < 0.05$ (a ≠ b).
[1]MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

Breeding Interval (Embryonic Mortality)

The time between successive services within a reproductive cycle was computed with the objective of inferring the cause of reproductive failure based on the delay before the next estrus and service (Supplemental Figure S2; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). Breeding intervals of less than 3 d were attributed to security breeding and were excluded from the analysis. Intervals for analysis are shown in Table 7.

Although it is not the only source of delayed breedings, services occurring after more than 30 d (breeding interval > 30 d) were classified as having a higher probability to be the result of embryonic mortality. This binary outcome was analyzed using generalized linear mixed models with the procedure GLIMMIX in SAS 9.4

For the "all herds" data set, we used the following model, as described by equation 9:

$$Y_{ijklmn} = \mu + conception_i + b_1 PADF_j + parity_k + conception_i \times parity_k + hrd_l \times conception_i + serviceyear_m + cow_{iln} + e_{ijklmn}, \quad [9]$$

where Y_{ijklmn} is the reproductive failure cause (0 = other, 1 = embryonic mortality); μ is the overall mean effect; $conception_i$ is the fixed effect of the ith method used to conceived that cow (i = AI, MOET, IVF); b_1 is the regression coefficient of Y on the PA DF ($PADF_j$); $PADF_j$ is the measured value of the jth parents; $parity_k$ is the fixed effect of the parity of the cow (k = 0, 1, 2, 3); $conception_i \times parity_k$ is the fixed effect of the interaction of the ith conception method with the kth parity; $hrd_l \times conception_i$ is the random interaction of the lth herd with the ith conception method, $hrd_l \times conception_i \sim N\left(0, \sigma^2_{hrd\times conception}\right)$; $serviceyear_m$ is the random effect of the mth service year (m = 2012, . . . , 2018), $serviceyear_m \sim N\left(0, \sigma^2_{serviceyear}\right)$; cow_{iln} is the random effect of the nth cow from the ith conception of the lth herd, $cow_{iln} \sim N\left(0, \sigma^2_{cow}\right)$; e_{ijklmn} is the random residual $e_{ijklmn} \sim Bin(n, p)$.

For the "IVF herds" data set, we used the following model, as described by equation 10:

$$Y_{ijklmn} = \mu + conception_i + b_1 PADF_j + parity_k + conception_i \times parity_k + hrd_l \times conception_i + cow_{ilm} + e_{ijklm}, \quad [10]$$

where Y_{ijklmn} is the reproductive failure cause (0 = other, 1 = embryonic mortality); μ is the overall mean effect; $conception_i$ is the fixed effect of the ith method used to conceived that cow (i = AI, MOET, IVF); b_1 is the regression coefficient of Y on the PA DF ($PADF_j$); $PADF_j$ is the measured value of the jth parents; $parity_k$ is the fixed effect of the parity of the cow (k = 0, 1, 2, 3); $conception_i \times parity_k$ is the fixed effect of the interaction of the ith conception method with the kth parity; $hrd_l \times conception_i$ is the random interaction of the lth herd with the ith conception method, $hrd_l \times conception_i \sim N\left(0, \sigma^2_{hrd\times conception}\right)$; cow_{ilm} is the random effect of the mth cow from the ith conception of

Table 7. Data available for breeding interval (embryonic mortality) models

	All herds				IVF herds			
Conception method[1]	Animal (n)	Breeding (total)	Breeding (breeding interval >30 d)	% of >30-d breeding interval	Animal (n)	Breeding (total)	Breedings (breeding interval >30 d)	% of >30-d breeding interval
AI	249,970	966,891	571,146	59.07	13,831	52,260	31,480	60.24
Embryo transfer (MOET)	10,400	41,677	24,506	58.80	2,753	10,781	6,356	58.96
IVF	482	2,061	1,264	61.33	482	2,061	1,264	61.33

[1]MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

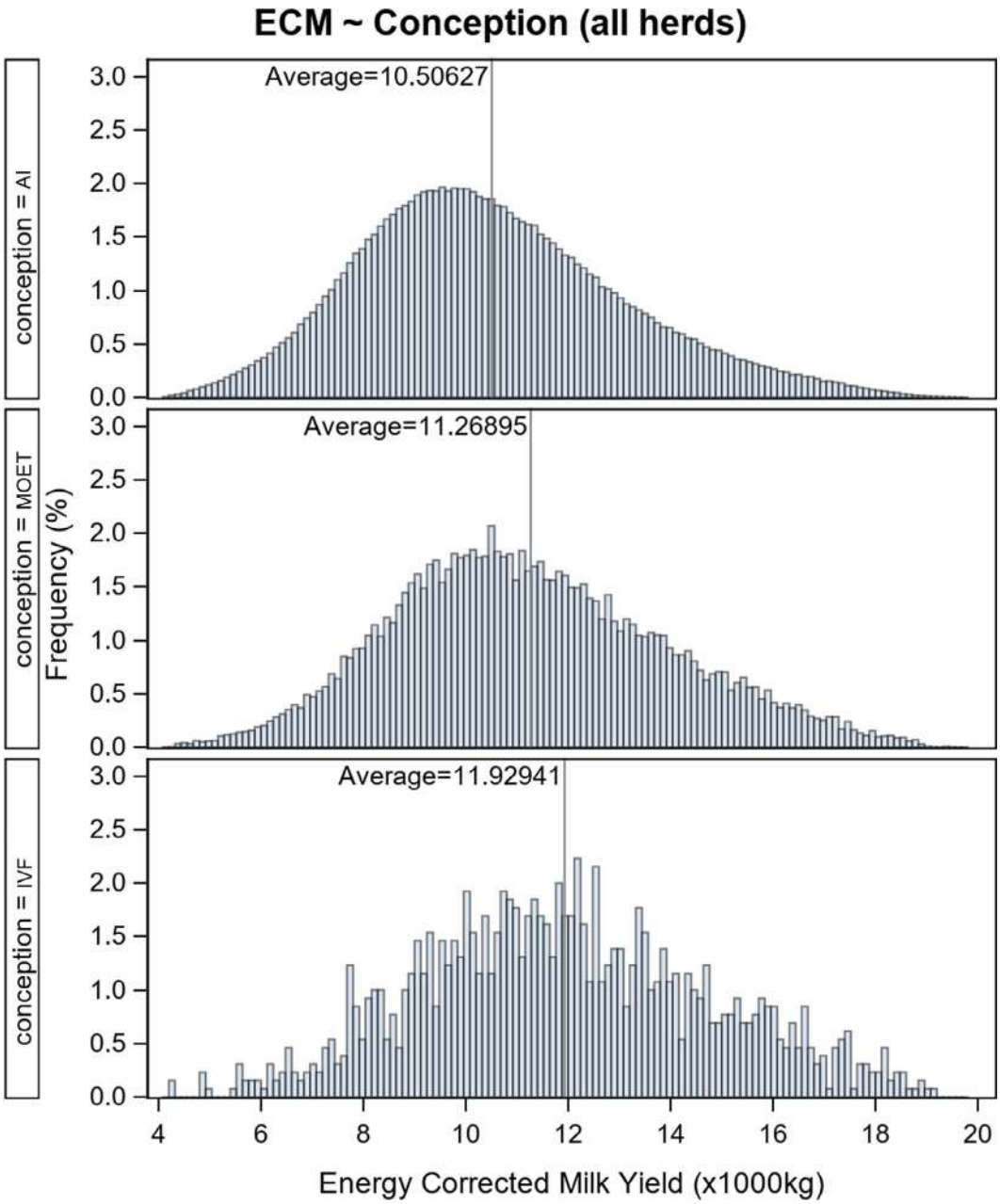


Figure 1. Distribution of lactation ECM yield across conception methods for cows in all herds. Conception is the method by which the cow was conceived. MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

the lth herd, $cow_{ilm} \sim N\left(0, \sigma^2_{cow}\right)$; e_{ijklm} is the random residual, $e_{ijklm} \sim Bin(n,p)$.

RESULTS

Production

ECM and LPI Distribution. We first explored the data by observing the distribution of major outcomes, including ECM production and LPI. We observed visual differences in the distribution of ECM between conception methods (Figure 1; Supplemental Figure S3; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). These differences were significant in the "all herds" data set (Figure 2), as compared with the "IVF herds," where the differences were in the same direction but not significant (Supplemental Figure S4; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022).

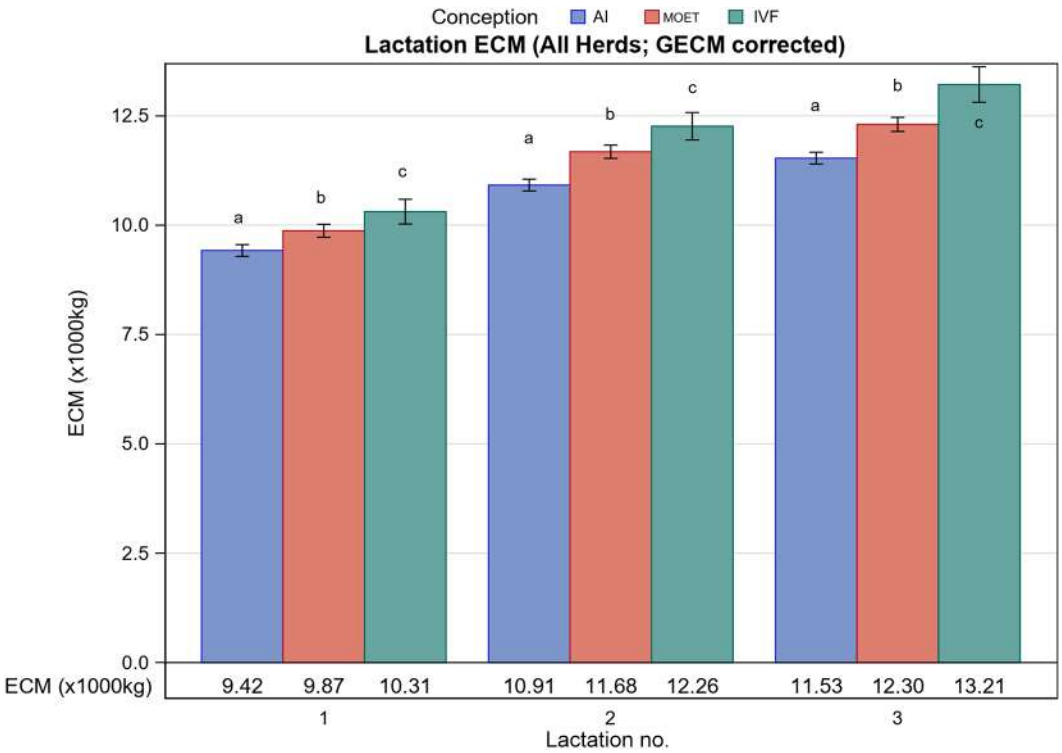


Figure 2. Conception method × parity (lactation no.) interaction LSM. Lactation ECM yields across conception methods and parity (lactation no.) for cows in all herds. The statistical model used also included fixed effects for sire and dam genetic ECM (GECM) breeding values as well as herd × conception method and herd × lactation year interactions random effects. Error bars represent 95% confidence limit. Means with different lowercase letters (a–c) for the same lactation no. differ with $P < 0.05$ (a ≠ b). Conception is the method by which the cow was conceived. MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

Similarly, some differences in the distribution of LPI were observed between AI, MOET, and IVF animals. Dam LPI ranged from 2,027.17 ± 317.71 (mean ± SD) on average for AI daughters, 2,362.6 ± 342.17 for MOET daughters, and 2,420.05 ± 321.87 for IVF daughters. The dispersion was smaller for sire LPI with average scores of 2,421.03 ± 361.88, 2,587.40 ± 328.21, and 2,668.60 ± 277.27 for AI, MOET, and IVF daughters, respectively. The distribution of parent LPI across the 3 conception methods is available in Supplemental Figure S5 (https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022).

Effect of Factors on ECM. The effects of variables included in the models can are presented in Table 8. Sire GECM, dam GECM, and the interaction between the lactation number and the conception method all had a significant effect on the daughter ECM. The least squares means of the conception × lactation number parameter, which highlight the interaction between the parity and the conception method, were all different for the "all herds" data set and ranged from 9,418 ± 69 kg (mean ± SEM; AI) to 10,306 ± 144 kg (IVF) for the first lactation, 10,914 ± 69 kg (AI) to 12,258 ± 160 kg (IVF) for the second lactation, and 11,529 ± 69 kg (AI) to 13,213 ± 207 kg (IVF) for the third lactation (Figure 2). Conversely, for the "IVF herds" data set, higher parity animals still performed better than lower parity ones, but the conception method did not affect production within a parity. Those ranged from 10,480 ± 117 kg (MOET) to 10,516 ± 148 kg (IVF) for the first lactation, 12,164 ± 106 kg (AI) to 12,465 ± 164 kg (IVF) for the second lactation, and 12,782 ± 108 kg (AI) to 13,413 ± 0.214 kg (IVF) for the third lactation (Supplemental Figure S4; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022).

The effects of the parents' genetic potential, included here in the form of sire and dam GECM, were highly significant in both data sets ($P < 0.0001$). Omitting these 2 variables in the models led to even higher estimated ECM values for MOET and IVF animals in the "all herds" analysis. In "IVF herds," the lack of a genetic parameter resulted in significant differences at the second and third lactation (Supplemental Figure S7; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). Correcting for the LPI of parents instead of GECM also yielded the same conclusions.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 8. Effects of the conception method, sire genetic ECM, dam genetic ECM, lactation number, and lactation number × conception method on cows' lactation ECM yield in all herds or in herds containing IVF animals (IVF herds) and the variance components of year of lactation, herd × conception, herd × lactation year, and residuals

	Fixed effect[2] (P-value)					Variance component[3]			
Data set[1]	Conception	Sire GECM	Dam GECM	Lact_no	Lact_no × conception	Lactyear	Hrd × conception	Hrd × lactyear	Residual
All herds	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.03101	0.9983	0.2032	4.6329
IVF herds	0.0774	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003	0.03313	0.9804	0.1703	5.0676

[1]IVF = in vitro fertilization.
[2]GECM = genetic ECM; Lact_no. = lactation number.
[3]Lactyear = year of lactation; Hrd = herd.

Lifetime Performance Index

We investigated the spread between the average LPI of parents and the LPI of the daughter. On average, AI and MOET daughters had scores 14.29 ± 126.10 (mean ± SD) and 18.63 ± 122.59 points higher than their parents, whereas IVF daughters scores were 0.74 ± 126.36 point higher than their parents (Figure 3 A). Statistical modeling revealed significant effects of the conception method, PA LPI, and daughter birth date (Table 9). The least squares means of the conception method effect were 15.74 ± 1.08 (mean ± SEM) for AI, 14.23 ± 1.97 for MOET, and −3.34 ± 4.47 for IVF (Figure 3B). We found a difference between IVF and AI ($P < 0.0001$), as well as between AI and ET ($P = 0.0009$). Both birth date and PA were positively correlated with LPI difference with regression coefficients of 0.01218 ± 0.003003 (LPI_dif/day) and 0.005424 ± 0.000896 (LPI_dif/PA_LPI), respectively.

Estimates for year effects on LPI also revealed differences in the rate of improvement between conception methods (Figure 4). When looking at the data without statistical adjustment for other effects, the rate of improvement for AI was 98.06 ± 0.25 LPI points per year, 71.09 ± 1.12 points per year for MOET, and 48.33 ± 5.49 points per year for IVF (Supplemental Figure S8; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022).

Fertility

DF. To investigate the potential effect on fertility, we looked at the DF index across the 3 conception methods. The MOET and IVF cows ranked lower than their AI counterparts ($P < 0.05$; Supplemental Figure S9; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). To further isolate any potential epigenetic effect from the breeding method, we computed a difference between the DF score of the daughter and the average DF of the parents (DF_Dif). This allowed us to identify deviations from the expected value for the daughter. The conception method, PA DF, and daughter birth date had significant effects on the DF_Dif (Table 10).

The DF of MOET and IVF daughters were lower than the scores of their parents by an average of 1.17 points, whereas the DF of AI daughters were lower than the scores of their parents by 0.34 points ($P < 0.05$; Figure 5).

Interval from First Service to Conception. The time elapsed between the first breeding and the moment when conception was achieved varied in relation to the conception method used to produce the cow, both in "all-herds" ($P = 0.0099$) and "IVF herds" ($P = 0.0024$). In vitro fertilization animals took on average between 3.06 and 4.44 more days to be conceived than AI and MOET animals (Table 5).

Age at First Service. The age at which heifers are first bred is highly dependent on management, as demonstrated by the herd × conception variance component explaining 42% and 29% of the variance in "all herds" and "IVF herds," respectively (Table 11). Still, in "all herds," a significant effect of conception was identified, with MOET and IVF animals being bred for the first time 6.77 ($P < 0.0001$) and 9.93 ($P = 0.026$) days earlier than AI heifers. We found no differences between conception methods in "IVF herds" (Table 6).

Breeding Interval. In the case of a return to estrus, looking at the interval between the 2 services gives us a clue as to what caused the failure. We assumed that 2 successive breedings occurring less than 30 d apart were likely due to a gamete or reproductive tract problem prohibiting fertilization or causing early preimplantation embryonic death. This early conception failure thus led the cow to cycle again. However, a breeding interval of more than 30 d potentially implied a delay in the normal estrous cycle of the cow, which we attributed to the embryo having developed enough for pregnancy recognition signaling to have occurred. We used these assumptions to create the following binary outcome: ≤30 d breeding interval or >30 d breeding interval. It should be noted that extended breeding in-

Table 9. Effects of the conception method, parent average Lifetime Performance Index, and birthdate on daughter-parent average Lifetime Performance Index difference and the variance components of herd × conception and residuals

	Fixed effect[2] (*P*-value)			Variance component[3]	
Data set[1]	Conception	PA	Birthdate	Hrd × conception	Residual
All herds	<0.0001	<0.0001	<0.0001	33.0934	14,756
IVF herds	0.0002	<0.0001	<0.0001	103.98	15,601

[1]IVF = in vitro fertilization.
[2]PA = parent average.
[3]Hrd = herd.

terval can be the results of other factors such as a lack of estrus detection.

In the "all herds" data set, we found a significant interaction between the parity and the conception method (Table 12), but the only differences were between AI and MOET animals for the first and second parity. Multiple ovulation embryo transfer cows had a reduced probability of embryonic mortality [first parity odds ratio = 0.854; 95% CI (0.808, 0.903) and second parity odds ratio = 0.880; 95% CI (0.830, 0.934)]. The signifi-

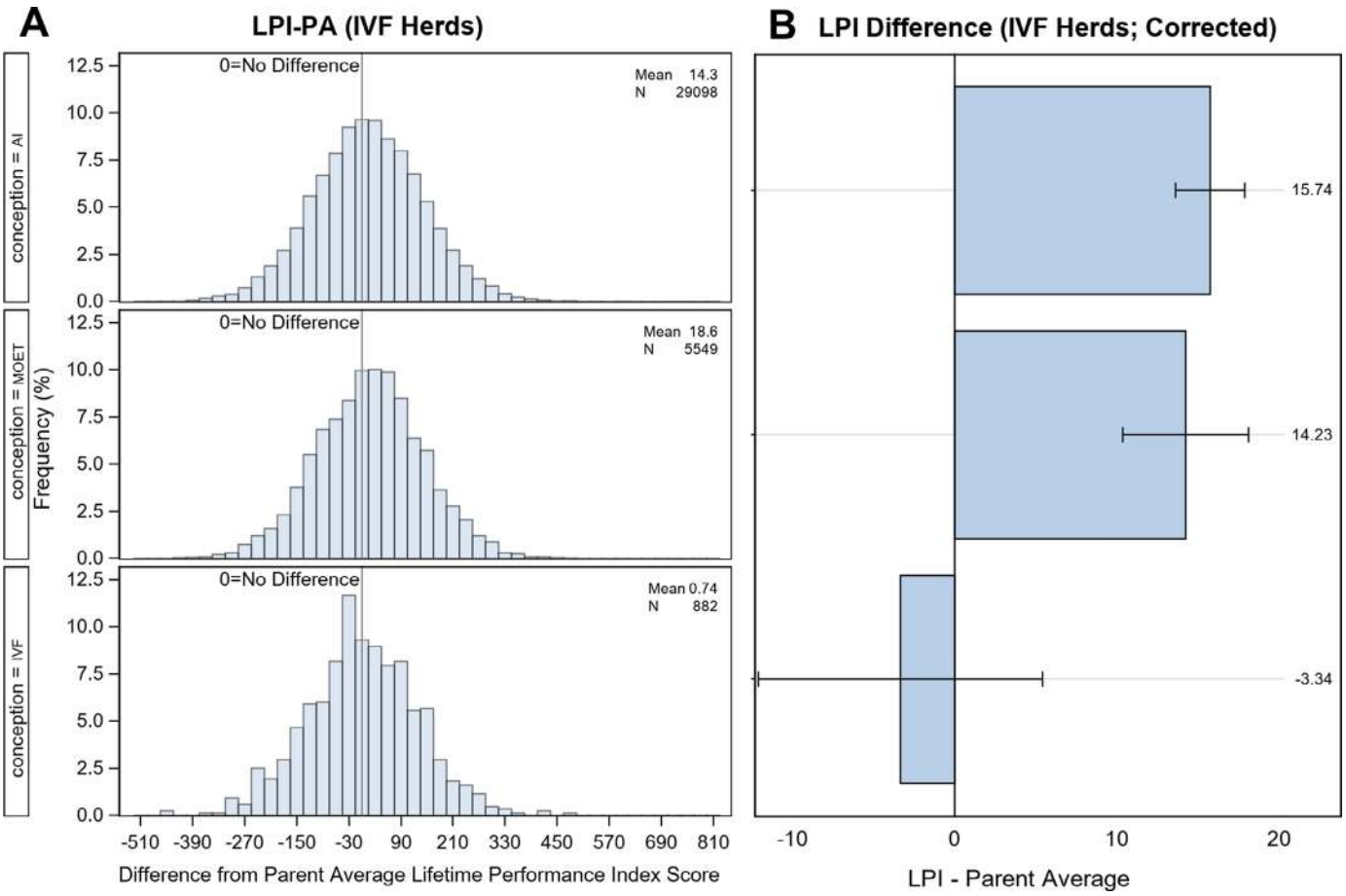


Figure 3. Lifetime performance index (LPI) difference between daughter and parent average (PA; daughter LPI − PA LPI). A positive value represents a daughter scoring better than the mean of her sire and dam LPI; likewise, a negative value represents an underperformance of the daughter on the index in relation to her genetic potential. (A) Distribution of LPI difference across conception methods for daughters in herds containing at least 1 IVF-derived cow. (B) Conception methods LSM. The statistical model used also included fixed effects for the parent average LPI and daughter birth date as well as a random effect for the herd × conception method interaction. Error bars represent 95% confidence limit. Conception is the method by which the cow was conceived. MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

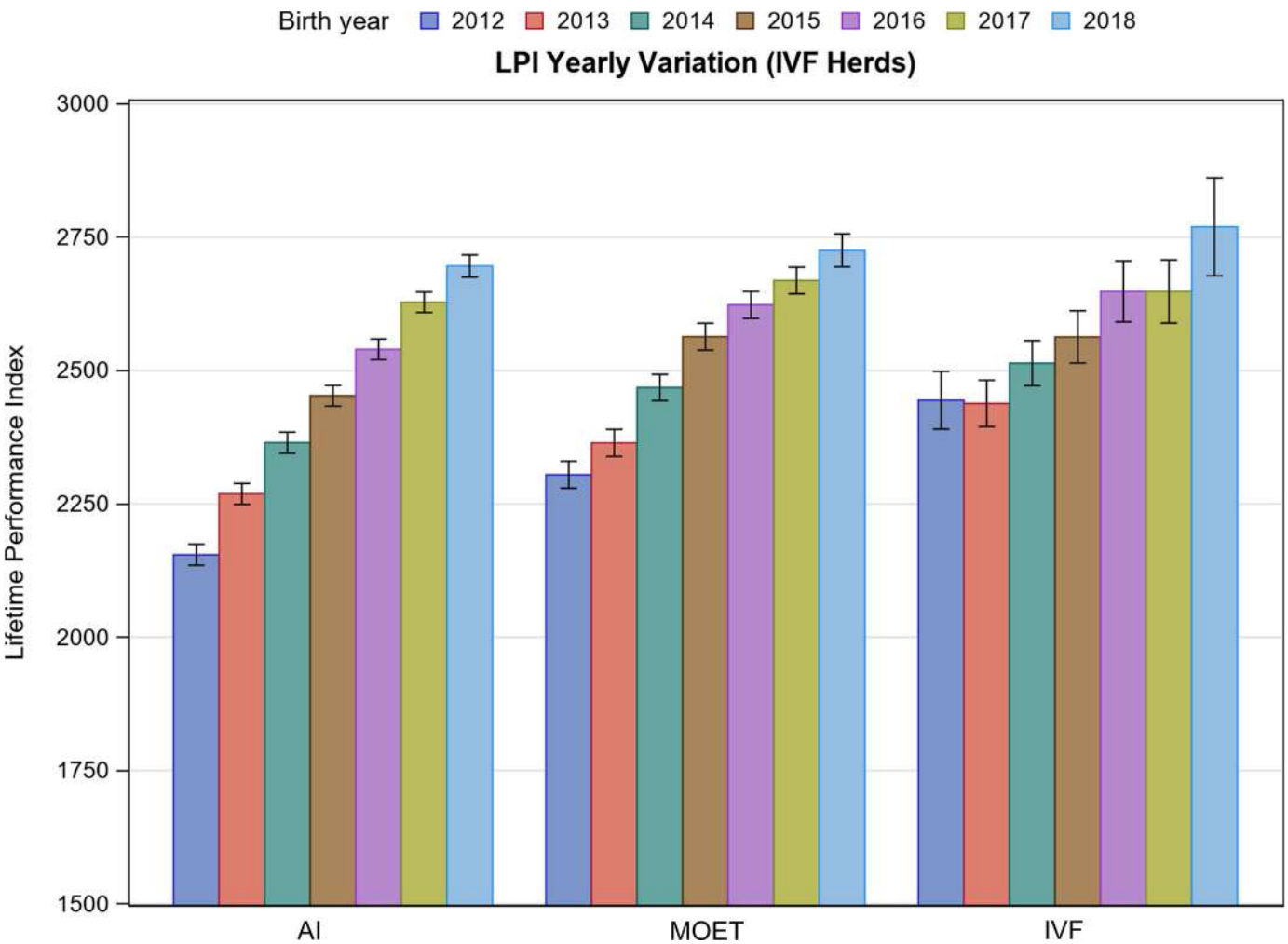


Figure 4. Lifetime performance index (LPI) across years and conception methods for cows in herds containing at least 1 IVF-derived cow: Cow birth year × conception method interaction LSM. The statistical model used also included herd × conception method interaction random effects. Error bars represent 95% confidence limit. Conception is the method by which the cow was conceived. MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

cant interaction between the parity and the conception method was also present in "IVF herds." However, after correcting for the multiple comparisons, no difference could be observed between the different conception methods in cows with the same parity number.

DISCUSSION

In this study, we found that the MOET and IVF conception methods had a favorable long-term effect on milk production when compared in "all herds," but the

Table 10. Effects of the conception method, parent average daughter fertility, and birthdate on daughter-parent average daughter fertility difference and the variance components of herd × conception and residuals

	Fixed effect[2] (*P*-value)			Variance component[3]	
Data set[1]	Conception	PA	Birthdate	Hrd × conception	Residual
All herds	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.7389	6.2709
IVF herds	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1.2013	6.4934

[1]IVF = in vitro fertilization.
[2]PA = parent average.
[3]Hrd = herd.

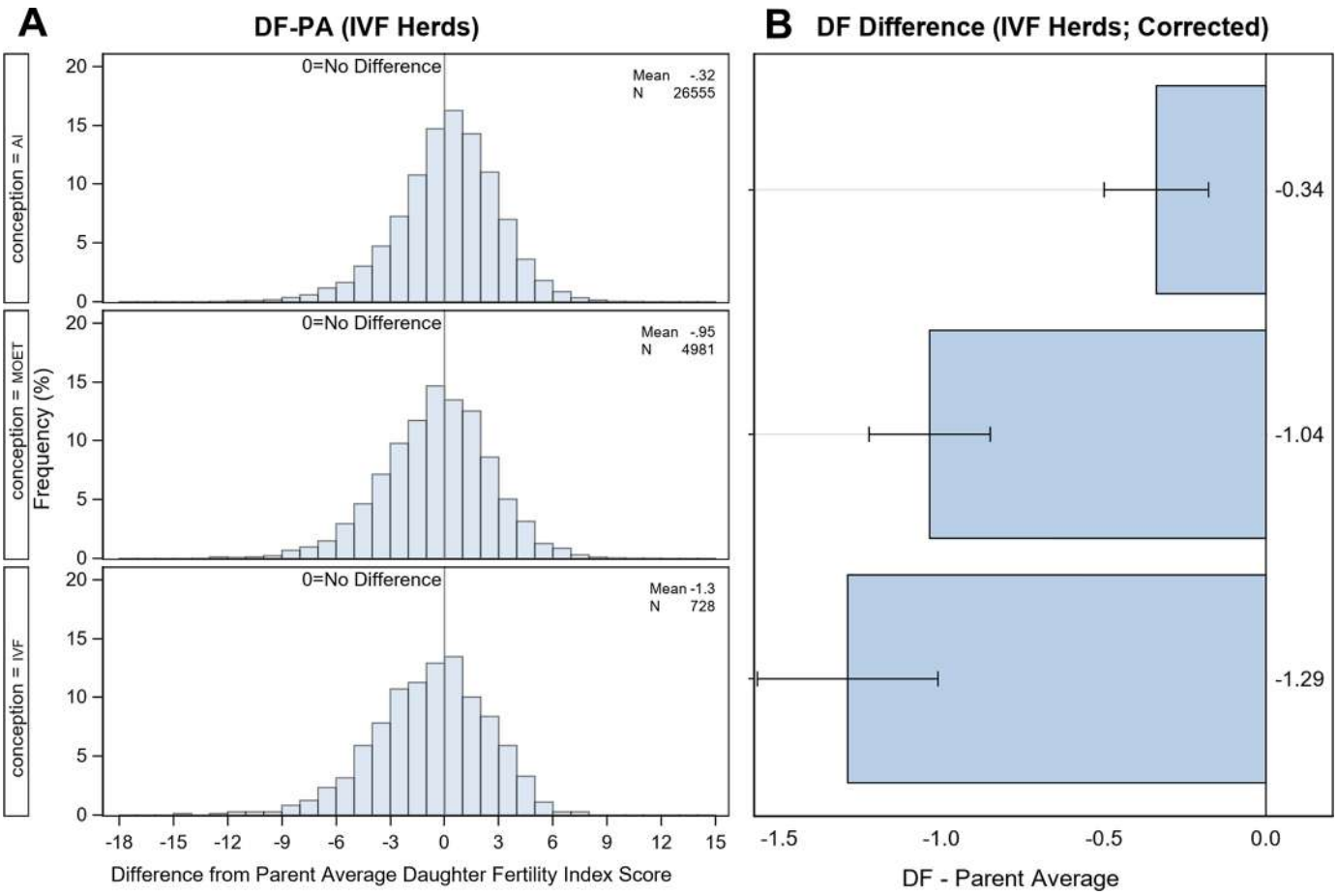


Figure 5. Daughter fertility index (DF) difference between daughter and parent average (PA) (daughter DF − PA DF). A positive value represents a daughter scoring better than the mean of her sire and dam DF; likewise, a negative value represents an underperformance of the daughter on the index in relation to her genetic potential. (A) Distribution of DF difference across conception methods for daughters in herds containing at least 1 IVF-derived cow. (B) Conception methods LSM. The statistical model used also included fixed effects for the parent average DF and daughter birth date as well as a random effect for the herd × conception method interaction. Error bars represent 95% confidence limit. Conception is the method by which the cow was conceived. MOET = multiple ovulation embryo transfer; IVF = in vitro fertilization.

differences were nonsignificant in herds where at least 1 IVF animal was present. The IVF conception method had mild negative effects on fertility when normalized for the genetic factors of parents.

Confounding Factors

A similar caveat to retrospective cohort studies on the effects of ART in cattle and humans is the nonrandom attribution of treatments to the population. In humans, patients undergoing ART are likely to suffer from conditions causing subfertility or infertility that are then linked to adverse outcomes for the embryo, postnatal development, or both (Feuer et al., 2013; Fauser et al., 2014). Cattle derived from ART, on the other hand, are likely to descend from the most valuable animals in the population in terms of genetic potential and, thus, their parents have higher ability to produce milk and to stay healthy and fertile (Mueller and Van Eenennaam, 2022). The higher economic value linked to these traits makes these ART animals (both dam and daughters) prone to receiving different treatments compared with the average cow, consequently introducing an environmental (management) bias possibly compounding the aforementioned genetic bias. To circumvent these challenges, several analytical methods were employed in this study. To address differences in management, we performed statistical modeling on all available data (the "all herds" data set), as well as on a more restricted data set (the "IVF herds" data set), which included only the herds containing 1 or more IVF-derived cows during the studied period. We hypothesized that limiting the analysis to herds containing IVF animals allowed for a more direct comparison

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 11. Effects on age at first service

	Fixed effect[2] (P-value)			Variance component[3]	
Data set[1]	Conception	PADF	Birthdate	Hrd × conception	Residual
All herds	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1,008.82	1,424.21
IVF herds	0.6431	0.0593	<0.0001	683.39	1,634.36

[1]IVF = in vitro fertilization.
[2]PADF = parent average daughter fertility.
[3]Hrd = herd.

of ART animals to their peers and limited the herd management variability. On the other hand, the results of the comparisons made with the "all-herds" data set were more indicative of the differences due to conception methods in the Holstein breed in general.

Other methods were used to control and correct for the differences in genetic potential and were treated in their respective sections. These methods included adding the breeding values of the parents as covariates, or in some cases, looking at the daughter deviation from the parents average to limit this bias.

Similar Milk Production at Constant Genetic Potential

Assisted-reproduction technologies are used in dairy breeding programs to accelerate the development of high genetic potential animals and to quickly disseminate those genetic gains. Our observations support that framework, with cows derived from MOET, and even more so from IVF, tending to have higher parent LPI scores (Supplemental Figure S5; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022) and GECM (Supplemental Figure S6; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022), thus higher recorded ECM values (Figure 1).

Likewise, by not correcting for that higher GECM value, our statistical model showed differences of + 647 kg ($P = 0.007$) and + 976 kg ($P < 0.0036$) for IVF animals in the second and third lactations (Supplemental Figure S7; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). However, by introducing dam GECM and sire GECM as covariates in our model to compensate for the nonrandom attribution of conception methods across GECM values, we found no differences between conception methods (Supplemental Figure S4; https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC; Lafontaine, 2022). This is in accordance with previous studies (Siqueira et al., 2017; Baruselli et al., 2021), where no differences between AI, IVF, and MOET were found for the first lactation. However, Siqueira et al. (2017) observed a reduction of milk, protein, and fat yields in the first lactation of IVF-derived cows when reverse X-sorted semen was used. In both "all herds" and "IVF herds" data sets, a conception method X parity interaction was present, alluding to a variable response to the conception method as the cows matured. However, after adjusting for the multiple comparisons, we did not have the statistical power to identify differences between conception methods within parity for IVF herds.

Table 12. Effects of the conception method, number of previous parities (parity) and conception × parity on breeding interval (embryonic mortality)

	Fixed effect[2] (P-value)			
Data set[1]	Conception	Parity	Conception × parity	PADF
All herds	<0.0001	0.6584	0.0015	<0.0001
IVF herds	0.1419	0.5363	0.0284	0.0020

[1]IVF = in vitro fertilization.
[2]PADF = parent average daughter fertility.

Lower Genetic Merit Compared with PA

To have a more holistic view of the overall animal performance according to the conception method, we turned to the standard genetic index used by Canadian producers, which is the LPI. Because we expected the offspring to inherit the average breeding value of its parents, we hypothesized that an epigenetic effect of conception methods would manifest itself in the form of a bias in Mendelian sampling, meaning the scores for daughters would be different from the mean of scores for parents. To explore this idea, we devised a simple variable calculated by subtracting the average LPI of parents from the LPI of the daughter. We found that MOET and AI daughters tended to gain 14 and 16 LPI points relative to their parents, a 0.06% improvement based on a global LPI average of 2,235. However, this positive skew was not observed in IVF-derived animals (Figure 3B).

Although our study cannot point to a specific chromatin modification or physiological pathway, we ex-

plain part of the observed differences with epigenetic alterations because of the following reasoning: because the difference in animal phenotype (daughter LPI) is not fully explained by genotype (PA LPI) or by environment (herd and birth date random effect), we assume that the differences are the result of genotype × environment interaction, which could be mediated by epigenetic mechanisms (Liu et al., 2008; Ladd-Acosta and Fallin, 2016). Indeed, this difference could be the result of epigenetic insults leading to suboptimal development and then lower performance, health, fertility, or both. The fact that MOET embryos were not different from AI embryos led us to hypothesize that the negative effect was likely attributable to the procedures not shared by MOET and IVF, namely, in vitro maturation, IVF, and embryo culture. A potential confounding factor could be that the averages of parents were biased, leading to a perceived over- or underperformance of the offspring. However, integrating reliability for sire and dam LPI into the models did not affect our conclusions.

Slower Rate of Genetic Progress

We further investigated the positive relationship between LPI and birth date. We observed that for a given year, LPI was higher in the IVF population, but the year over year increase was lower compared with AI and MOET (Figure 4). Although the specific reasons for that slower progress are hard to identify, the decreased rate of progress would be coherent with detrimental effects of ART on development, thereby decreasing gain per generation. The reason is likely not entirely epigenetic and one contributing factor could be that the probability of a positive error term between each generation is smaller in the small elite genetic population. Trends in the relative improvement in maximum annual milk yield (kg/cow/year) in the United States indicate that the highest milk producers are improving slower than they used to, but still at a higher pace than the average US milk yield (Brito et al., 2021). Though possible, a stagnation of genetic progress due to exhaustion of genetic variation has been deemed unlikely, especially considering the broad nature of the traits included in the index (Janick, 2010; Hill, 2016). To our knowledge, this trend of slower genetic improvement in ART-derived cattle has not been previously reported and warrants further research.

Lower Average Fertility Compared with PA

A similar phenomenon to the LPI-PA difference was also observed for the DF subindex. This time, it was a difference between AI and the 2 ART methods: IVF and MOET (Figure 5).

This contrast suggests that the fertility effect is being attributed to the common conditions of the production of IVF and MOET embryos, including hormonal treatment of the donor in the case of ovarian stimulation or superovulation, exposure to the ex vivo environment (more extensive for IVF, shorter and less intrusive for MOET), and recipient preparation protocols.

Oocyte development is a critical period for programming as several maternal factors are accumulated during this phase, many of which will have an imprint maintenance role during embryo development (Denomme and Mann, 2013; Farhadova et al., 2019). Changes in ovarian conditions due to exogenous hormones can impair this oocyte programming, leading to differential gene expression in the embryo (Mundim et al., 2009).

Both MOET and IVF embryos are exposed to conditions different from the female reproductive tract; for example, exposure to light (Oh et al., 2007; Ottosen et al., 2007), oxygen concentration (Skiles et al., 2018; de Lima et al., 2020), or composition of culture/transfer media (Enright et al., 2000; Simopoulou et al., 2018; de Lima et al., 2020). This is exemplified by lower fertility parameters such as sperm concentration and motility in male mice resulting from in vitro embryo culture. These lower fertility parameters in turn caused a reduction in pregnancy rates (Calle et al., 2012). More evidence pointing specifically toward embryo manipulations is the lack of difference in inter- and trans-generational fertility between mouse embryos that had undergone in vitro culture or were directly transferred into recipients (Mahsoudi et al., 2007). However, the comparison did not extend to natural mating or offspring derived from AI.

To further isolate the causes of the lower index score for IVF and MOET animals, we looked at individual components such as the interval from first service to conception. Our analysis revealed that IVF animals required, on average ,3.06 to 4.44 more days to conceive, which translate to approximately one additional cycle to reach pregnancy every 5 to 6 cows. We tried examining the causes of these breeding failures by looking at the interval between each successive service. Although, MOET animals seemed to have reproductive failure happening earlier postinsemination than AI animals, we could not specifically point to a particular change in embryonic mortality for ART cows.

Another factor in the DF subindex, the age at first service, revealed that the MOET and IVF animals entered reproduction at a younger age compared with the rest of the population. This potentially offset the negative scores on some of the other fertility traits. However, that difference was not observed in the "IVF herds" data set, further indicating the large effect of management on the age at first service.

CONCLUSIONS

The long-term epigenetic effects of ART remain challenging to quantify. Still, cattle from the Canadian dairy industry are suitable candidates for large scale cohort studies due to the phenomenal amount of data generated by industry stakeholders. This context makes this study the first of this scale to compare conception methods. Our results suggested that IVF animals are more productive than the general Holstein population but not significantly more productive than other animals within their herds (IVF herds). Assisted-reproduction technologies employed seem to not negatively affect milk production, a critical economic factor and window into the cow's metabolic health. On the other hand, a penalty seems to subsist in the form of a slight decrease in fertility for MOET and IVF animals, and a slower growth in breeding values of the IVF population. This work will allow producers to make better-informed decisions about the conception method to use for their herds and enable the dairy genetic industry to address identified problems.

ACKNOWLEDGMENTS

The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada—Collaborative Research and Development (NSERC ALLRP 547639-19; Ottawa, ON, Canada) with Novalait (Québec, QC, Canada), SEMEX (Saint-Hyacinthe, QC, Canada), and Lactanet (Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) as industrial partners provided funding for this study. S. Lafontaine received studentship support from Fonds de Recherche du Québec—Nature et Technologies (FRQNT; Québec, QC, Canada). We thank René Lacroix (Lactanet), Gerrit Kistemaker (Lactanet), and Pascal Lemire (Holstein Canada; Brantford, ON, Canada) for their advice and contributions in the preparation of the data. The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

Baruselli, P. S., C. A. Rodrigues, R. M. Ferreira, J. N. S. Sales, F. M. Elliff, L. G. Silva, M. P. Viziack, L. Factor, and M. J. D'Occhio. 2021. Impact of oocyte donor age and breed on in vitro embryo production in cattle, and relationship of dairy and beef embryo recipients on pregnancy and the subsequent performance of offspring: A review. Reprod. Fertil. Dev. 34:36. https://doi.org/10.1071/RD21285.

Bonilla, L., J. Block, A. C. Denicol, and P. J. Hansen. 2014. Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. J. Dairy Sci. 97:229–239. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6943.

Brito, L. F., N. Bedere, F. Douhard, H. R. Oliveira, M. Arnal, F. Peñagaricano, A. P. Schinckel, C. F. Baes, and F. Miglior. 2021. Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. Animal 15:100292. https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100292.

Calle, A., A. Miranda, R. Fernandez-Gonzalez, E. Pericuesta, R. Laguna, and A. Gutierrez-Adan. 2012. Male mice produced by in vitro culture have reduced fertility and transmit organomegaly and glucose intolerance to their male offspring. Biol. Reprod. 87:1–9. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.100743.

Caramaschi, D., J. Jungius, C. M. Page, B. Novakovic, R. Saffery, J. Halliday, S. Lewis, M. C. Magnus, S. J. London, S. E. Håberg, C. L. Relton, D. A. Lawlor, and H. R. Elliott. 2021. Association of medically assisted reproduction with offspring cord blood DNA methylation across cohorts. Hum. Reprod. 36:2403–2413. https://doi.org/10.1093/humrep/deab137.

CDN. 2022. Canadian Dairy Network - Lifetime Performance Index (LPI) Formula. Accessed Apr. 19, 2022. https://www.cdn.ca/document.php?id=443.

Ceelen, M., M. M. van Weissenbruch, J. P. W. Vermeiden, F. E. van Leeuwen, and H. A. Delemarre-van de Waal. 2008. Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: Follow-up study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93:1682–1688. https://doi.org/10.1210/jc.2007-2432.

Chen, M., and L. K. Heilbronn. 2017. The health outcomes of human offspring conceived by assisted reproductive technologies (ART). J. Dev. Orig. Health Dis. 8:388–402. https://doi.org/10.1017/S2040174417000228.

Chen, W., Y. Peng, X. Ma, S. Kong, S. Tan, Y. Wei, Y. Zhao, W. Zhang, Y. Wang, L. Yan, and J. Qiao. 2020. Integrated multiomics reveal epigenomic disturbance of assisted reproductive technologies in human offspring. EBioMedicine 61:103076. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103076.

Chen, Z., K. M. Robbins, K. D. Wells, and R. M. Rivera. 2013. Large offspring syndrome. Epigenetics 8:591–601. https://doi.org/10.4161/epi.24655.

Choufani, S., A. L. Turinsky, N. Melamed, E. Greenblatt, M. Brudno, A. Bérard, W. D. Fraser, R. Weksberg, J. Trasler, P. Monnier, W. D. Fraser, F. Audibert, L. Dubois, P. Julien, Z.-C. Luo, J. Michaud, J.-M. Moutquin, G. Muckle, J. Séguin, J. Trasler, R. E. Tremblay, H. Abenhaim, M.-J. Bédard, A. Bérard, E. Bujold, R. Gagnon, I. Girard, Z. Kibar, I. Marc, P. Monnier, M.-N. Simard, J.-C. Pasquier, and M. Welt. 2019. Impact of assisted reproduction, infertility, sex and paternal factors on the placental DNA methylome. Hum. Mol. Genet. 28:372–385. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy321.

Choux, C., C. Binquet, V. Carmignac, C. Bruno, C. Chapusot, J. Barberet, M. Lamotte, P. Sagot, D. Bourc'his, and P. Fauque. 2018. The epigenetic control of transposable elements and imprinted genes in newborns is affected by the mode of conception: ART versus spontaneous conception without underlying infertility. Hum. Reprod. 33:331–340. https://doi.org/10.1093/humrep/dex366.

Cole, J. B., S. A. E. Eaglen, C. Maltecca, H. A. Mulder, and J. E. Pryce. 2020. The future of phenomics in dairy cattle breeding. Anim. Front. 10:37–44. https://doi.org/10.1093/af/vfaa007.

de Lima, C. B., É. C. dos Santos, J. Ispada, P. K. Fontes, M. F. G. Nogueira, C. M. D. dos Santos, and M. P. Milazzotto. 2020. The dynamics between in vitro culture and metabolism: embryonic adaptation to environmental changes. Sci. Rep. 10:15672. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72221-1.

Denomme, M. M., and M. R. W. Mann. 2013. Maternal control of genomic imprint maintenance. Reprod. Biomed. Online 27:629–636. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.004.

Enright, B. P., P. Lonergan, A. Dinnyes, T. Fair, F. A. Ward, X. Yang, and M. P. Boland. 2000. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. Theriogenology 54:659–673. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00381-2.

Farhadova, S., M. Gomez-Velazquez, and R. Feil. 2019. Stability and lability of parental methylation imprints in development and disease. Genes (Basel) 10:999. https://doi.org/10.3390/genes10120999.

Farin, P. W., J. A. Piedrahita, and C. E. Farin. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology 65:178–191. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.022.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Fauser, B. C. J. M., P. Devroey, K. Diedrich, B. Balaban, M. Bonduelle, H. A. Delemarre-van de Waal, C. Estella, D. Ezcurra, J. P. M. Geraedts, C. M. Howles, L. Lerner-Geva, J. Serna, and D. Wells. 2014. Health outcomes of children born after IVF/ICSI: A review of current expert opinion and literature. Reprod. Biomed. Online 28:162–182. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.013.

Feuer, S. K., L. Camarano, and P. F. Rinaudo. 2013. ART and health: Clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies. Mol. Hum. Reprod. 19:189–204. https://doi.org/10.1093/molehr/gas066.

Gkourogianni, A., I. Kosteria, A. G. Telonis, A. Margeli, E. Mantzou, M. Konsta, D. Loutradis, G. Mastorakos, I. Papassotiriou, M. I. Klapa, C. Kanaka-Gantenbein, and G. P. Chrousos. 2014. Plasma metabolomic profiling suggests early indications for predisposition to latent insulin resistance in children conceived by ICSI. PLoS One 9:e94001. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094001.

Grace, K. S., and K. D. Sinclair. 2009. Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: A developmental time bomb still ticking. Semin. Reprod. Med. 27:409–416. https://doi.org/10.1055/s-0029-1237429.

Halliday, J., S. Lewis, J. Kennedy, D. P. Burgner, M. Juonala, K. Hammarberg, D. J. Amor, L. W. Doyle, R. Saffery, S. Ranganathan, L. Welsh, M. Cheung, J. McBain, S. J. C. Hearps, and R. McLachlan. 2019. Health of adults aged 22 to 35 years conceived by assisted reproductive technology. Fertil. Steril. 112:130–139. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.001.

Hill, W. G. 2016. Is continued genetic improvement of livestock sustainable? Genetics 202:877–881. https://doi.org/10.1534/genetics.115.186650.

IETS. 2020. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Pages 1–15 in Embryo Technology Newsletter.

Jamrozik, J., G. J. Kistemaker, T. C. S. Chud, and F. S. Schenkel. 2020. Estimates of genetic parameters for Holstein feed efficiency traits. CDN 9.

Janick, J. 2010. Long-term selection: Crops, animals, and bacteria. Pages 169–207 in Plant Breeding Reviews. John Wiley & Sons.

Koltes, J. E., J. B. Cole, R. Clemmens, R. N. Dilger, L. M. Kramer, J. K. Lunney, M. E. McCue, S. D. McKay, R. G. Mateescu, B. M. Murdoch, R. Reuter, C. E. Rexroad, G. J. M. Rosa, N. V. L. Serão, S. N. White, M. J. Woodward-Greene, M. Worku, H. Zhang, and J. M. Reecy. 2019. A vision for development and utilization of high-throughput phenotyping and big data analytics in livestock. Front. Genet. 10:1197. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01197.

Ladd-Acosta, C., and M. D. Fallin. 2016. The role of epigenetics in genetic and environmental epidemiology. Epigenomics 8:271–283. https://doi.org/10.2217/epi.15.102.

Lafontaine, S. 2022. Supplemental figures: Comparison of cattle derived from IVF, MOET, and AI for milk production and fertility traits. Borealis, V1. https://doi.org/10.5683/SP3/JOTBXC.

Lafontaine, S., R. Labrecque, J. M. Palomino, P. Blondin, and M.-A. Sirard. 2020. Specific imprinted genes demethylation in association with oocyte donor's age and culture conditions in bovine embryos assessed at day 7 and 12 post insemination. Theriogenology 158:321–330. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.027.

Liu, L., Y. Li, and T. O. Tollefsbol. 2008. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. Curr. Issues Mol. Biol. 10:25–36.

Mahsoudi, B., A. Li, and C. O'Neill. 2007. Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice. Biol. Reprod. 77:889–896. https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057885.

Mueller, M. L., and A. L. Van Eenennaam. 2022. Synergistic power of genomic selection, assisted reproductive technologies, and gene editing to drive genetic improvement of cattle. CABI Agric. Biosci. 3:13. https://doi.org/10.1186/s43170-022-00080-z.

Mundim, T. C., A. F. Ramos, R. Sartori, M. A. Dode, E. O. Melo, L. F. Gomes, R. Rumpf, and M. M. Franco. 2009. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. Genet. Mol. Res. 8:1398–1407. https://doi.org/10.4238/vol8-4gmr646.

Novakovic, B., S. Lewis, J. Halliday, J. Kennedy, D. P. Burgner, A. Czajko, B. Kim, A. Sexton-Oates, M. Juonala, K. Hammarberg, D. J. Amor, L. W. Doyle, S. Ranganathan, L. Welsh, M. Cheung, J. McBain, R. McLachlan, and R. Saffery. 2019. Assisted reproductive technologies are associated with limited epigenetic variation at birth that largely resolves by adulthood. Nat. Commun. 10:3922. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11929-9.

Oh, S. J., S. P. Gong, S. T. Lee, E. J. Lee, and J. M. Lim. 2007. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro. Fertil. Steril. 88:1150–1157. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.01.036.

Ottosen, L. D. M., J. Hindkjær, and J. Ingerslev. 2007. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. J. Assist. Reprod. Genet. 24:99–103. https://doi.org/10.1007/s10815-006-9081-x.

Penova-Veselinovic, B., P. E. Melton, R. C. Huang, J. L. Yovich, P. Burton, L. A. Wijs, and R. J. Hart. 2021. DNA methylation patterns within whole blood of adolescents born from assisted reproductive technology are not different from adolescents born from natural conception. Hum. Reprod. 36:2035–2049. https://doi.org/10.1093/humrep/deab078.

Rérat, M., Y. Zbinden, R. Saner, H. Hammon, and J. W. Blum. 2005. In vitro embryo production: Growth performance, feed efficiency, and hematological, metabolic, and endocrine status in calves. J. Dairy Sci. 88:2579–2593. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72934-9.

Simopoulou, M., K. Sfakianoudis, A. Rapani, P. Giannelou, G. Anifandis, S. Bolaris, A. Pantou, M. Lambropoulou, A. Pappas, E. Deligeoroglou, K. Pantos, and M. Koutsilieris. 2018. Considerations regarding embryo culture conditions: From media to epigenetics. In Vivo 32:451–460. https://doi.org/10.21873/invivo.11261.

Siqueira, L. G., M. V. G. Silva, J. C. Panetto, and J. H. Viana. 2019. Consequences of assisted reproductive technologies for offspring function in cattle. Reprod. Fertil. Dev. 32:82. https://doi.org/10.1071/RD19278.

Siqueira, L. G. B., S. Dikmen, M. S. Ortega, and P. J. Hansen. 2017. Postnatal phenotype of dairy cows is altered by in vitro embryo production using reverse X-sorted semen. J. Dairy Sci. 100:5899–5908. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12539.

Sirard, M. A., F. X. Grand, R. Labrecque, C. Vigneault, and P. Blondin. 2018. ASAS-SSR Triennial Reproduction Symposium: The use of natural cycle's follicular dynamic to improve oocyte quality in dairy cows and heifers. J. Anim. Sci. https://doi.org/10.1093/jas/sky050.

Skiles, W. M., A. Kester, J. H. Pryor, M. E. Westhusin, M. C. Golding, and C. R. Long. 2018. Oxygen-induced alterations in the expression of chromatin modifying enzymes and the transcriptional regulation of imprinted genes. Gene Expr. Patterns 28:1–11. https://doi.org/10.1016/j.gep.2018.01.001.

Urrego, R., N. Rodriguez-Osorio, and H. Niemann. 2014. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. Epigenetics 9:803–815. https://doi.org/10.4161/epi.28711.

Valenzuela-Alcaraz, B., F. Crispi, B. Bijnens, M. Cruz-Lemini, M. Creus, M. Sitges, J. Bartrons, S. Civico, J. Balasch, and E. Gratacós. 2013. Assisted reproductive technologies are associated with cardiovascular remodeling in utero that persists postnatally. Circulation 128:1442–1450. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002428.

van Wagtendonk-de Leeuw, A. M. 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. Theriogenology 65:914–925. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.007.

Viziack, M. P. 2020. Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE e FIV) no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas da

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

raça Holandesa. MS/PhD thesis. Department of Animal Reproduction, Universidade de São Paulo, Brazil.

Wilson, J. M., J. D. Williams, K. R. Bondioli, C. R. Looney, M. E. Westhusin, and D. F. McCalla. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. Anim. Reprod. Sci. 38:73–83. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01353-N.

Wu, C., and M.-A. Sirard. 2020. Parental effects on epigenetic programming in gametes and embryos of dairy cows. Front. Genet. 11:557846. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.557846.

Young, L. E., K. Fernandes, T. G. McEvoy, S. C. Butterwith, C. G. Gutierrez, C. Carolan, P. J. Broadbent, J. J. Robinson, I. Wilmut, and K. D. Sinclair. 2001. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. Nat. Genet. 27:153–154. https://doi.org/10.1038/84769.

Zandstra, H., A. P. A. van Montfoort, J. C. M. Dumoulin, L. J. I. Zimmermann, and R. N. H. Touwslager. 2020. Increased blood pressure and impaired endothelial function after accelerated growth in IVF/ICSI children. Hum. Reprod. Open 2020:hoz037. https://doi.org/10.1093/hropen/hoz037.

ORCIDS

Simon Lafontaine https://orcid.org/0000-0002-2159-3066
Marc-André Sirard https://orcid.org/0000-0001-8667-6682

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

J. Dairy Sci. TBC
https://doi.org/10.3168/jds.2023-24199
© TBC, The Authors. Published by Elsevier Inc. and Fass Inc. on behalf of the American Dairy Science Association®.
This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Early transcriptomic changes in peripheral blood 7 days post-embryo transfer in dairy cattle

A. Strangstalien,[1] C. U. Braz,[2] A. Miyamoto,[3] M. Marey,34 and H. Khatib1*
[1]Department of Animal and Dairy Sciences, University of Wisconsin-Madison, 1675 Observatory Dr., Madison, WI 53706, USA.
[2]Department of Animal Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1207 W. Gregory Dr. Urbana, IL 61801, USA.
[3]Global Agromedicine Research Center, Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan.
[4]Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Damanhour University, Behera, 22511, Egypt

ABSTRACT

A common goal of the dairy industry is to shorten the calving interval to reap several benefits associated with improved fertility. Early pregnancy detection is crucial to shorten this interval, allowing for prompt re-insemination of cows that failed to conceive after the first service. Currently, the industry lacks a method to accurately predict pregnancy within the first 3 weeks. The polypeptide cytokine interferon-tau (IFNT) is the primary signal for maternal recognition of pregnancy in ruminants. As IFNT is released from the early conceptus, it initiates a cascade of effects, including upregulation of interferon-stimulated genes (ISGs). Expression of ISGs can be detected in the peripheral blood. The present study aimed to characterize peripheral transcriptomic changes, including the ISGs, as early as d 7 post embryo transfer. A total of 170 Holstein heifers received in vitro-produced embryos. Whole blood was collected from these heifers within 24 h of the embryo transfer (d 0), d 7, and d 14 post embryo transfer. The heifers were divided into 2 groups, pregnant and nonpregnant, based on pregnancy diagnosis on d 28 via ultrasound. Total RNA was extracted from the peripheral blood of pregnant and nonpregnant heifers, pooled and sequenced. Expression analysis on d 7 heifers resulted in 13 significantly differentially expressed genes mostly related to innate immunity. Differential expression analysis comparing pregnant heifers on d 0 to the same heifers on d 14 showed 51 significantly differentially expressed genes. Eight genes were further quantified through RT-qPCR for biological validation. On d 7 post embryo transfer, mRNA transcriptions of *EDN1*, *CXCL3*, *CCL4*, and *IL1A* were significantly upregulated in pregnant heifers (n = 14) compared with nonpregnant heifers (n = 14), with respective fold changes of 8.10, 18.12, 29.60, and 29.97. While on d 14 post embryo transfer, mRNA transcriptions of *ISG15*, *MX2*, *OASY1*, and *IFI6* were significantly upregulated in the blood of pregnant heifers (n = 14) compared with the same heifers on d 0, with respective fold changes of 5.09, 2.59, 3.89, and 3.08. These findings demonstrate that several immune-related genes and ISGs are activated during the first 2 weeks after embryo transfer, which may explain how the maternal immune system accommodates the allogenic conceptus. To further investigate the diagnostic potentials of these genes, future studies are warranted to analyze the specificity and sensitivity of these biomarkers to predict early pregnancy.
Keywords: embryo transfer, transcriptomics, pregnancy prediction, interferon-stimulated genes, gene expression

INTRODUCTION

In the dairy industry, early detection of cows that failed to conceive after the first service and their rapid re-insemination is crucial to minimize the days open, which reaps several economic benefits such as increasing milk yield and the number of calves, and reducing breeding costs and culling rates (Balhara et al., 2013; Temesgen et al., 2022). There are several direct and invasive methods of pregnancy detection, such as ultrasound and doppler ultrasound (Pohler et al., 2016), and other indirect, noninvasive methods, such as pregnancy-associated glycoproteins (**PAGs**) and preimplantation factor (**PIF**) (Zoli et al., 1992; Gajewski et al., 2009; Ramu et al., 2013; Wallace et al., 2015; Wonfor et al., 2020). Ultrasound, doppler ultrasound, PAGs, and PIF can detect pregnancy by d 28, 25, 24, and 20 of gestation, respectively (Balhara et al., 2013; Ramu et al., 2013; Pohler et al., 2016; Filho et al., 2020). However, a reliable method to accurately predict pregnancy outcomes within the first 3 weeks is still nonexistent. Investigating the detailed embryo-maternal interactions

Received September 16, 2023.
Accepted November 12, 2023.
*Corresponding author: Hasan Khatib, Department of Animal and Dairy Sciences, 1675 Observatory Drive, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, USA, Tel.: (608) 263-3484, Email: hkhatib@wisc.edu

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

might be a promising approach to developing specific biomarkers for early pregnancy in cattle.

Maternal recognition and establishment of pregnancy require proper crosstalk between the early embryo and maternal innate immunity either locally at the embryo-maternal interface (Talukder et al., 2020) or systemically at the circulating immune cells for uterine receptivity and embryo tolerance (Oliveira et al., 2012; Gifford et al., 2019). The polypeptide hormone interferon-tau (**IFNT**) is the primary mediator for maternal recognition of pregnancy in ruminants (Hansen et al., 2017). It is secreted from the mononuclear trophectoderm of the conceptus around d 8, peaking at d 20 post-artificial insemination (**AI**) (Hirayama et al., 2014). IFNT specifically controls luteotropic and immune mechanisms, allowing for successful embryo implantation (Kowalczyk et al., 2021). It acts on the uterine endometrium to inhibit uterine pulse release of prostaglandin F2A (**PGF2A**), an inhibition critical for maintaining the corpus luteum (Basavaraja et al., 2021). Once released by the conceptus, IFNT binds to interferon α and β receptors (**IFNR**) subunits 1 and 2, initiating a cascade of effects, specifically through the classical type-1 interferon pathway (Toji et al., 2017; Basavaraja et al., 2019; Basavaraja et al., 2021).

IFNT also triggers the interferon-stimulated genes (**ISGs**) within various tissue types including the endometrium, luteal cells, liver, and in the peripheral blood, including peripheral blood mononuclear cells (**PBMCs**) and peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (**PMNs**) (Rani et al., 2007; Green et al., 2010; Bridi et al., 2018; Rashid et al., 2018; Kasimanickam et al., 2020; Basavaraja et al., 2021;). Classical ISGs include 15-ubiquitin-like modifier (**ISG15**), MX dynamin like GTPase 1 (**MX1**), MX dynamin like GTPase 2 (**MX2**), and 2'-5′-oligoadenlate synthetase 1 (**OAS1**) (Toji et al., 2017). The expression of ISGs in early pregnancy in ruminants stimulates the hyperplasia of the endometrial glands, stromal remodeling, and development of the uterine vasculature (Bazer, 2013) and induces a state of embryo immune tolerance indispensable for successful implantation and maintenance of pregnancy (Mishra et al., 2018). For this reason, peripheral expression of these genes has the potential to serve as early pregnancy biomarkers.

Several studies have investigated peripheral blood transcriptomic changes during early pregnancy. It has been demonstrated that the expression of classical ISGs (ISG15, MX1, and MX2) in circulating immune cells of pregnant cows was upregulated compared with the nonpregnant animals on d 21 of gestation in embryo-transferred Japanese Black cattle (Yoshino et al., 2023). Moreover, analyzing the transcriptomic profiles of peripheral immune cells from pregnant cows 21 d after embryo transfer revealed that over 600 genes were differentially expressed between pregnant and nonpregnant cows (De Los Santos et al., 2023). Those differentially expressed genes were related to immune tolerance, angiogenesis, inflammatory response, and cytokine secretion (De Los Santos et al., 2023). However, the earlier transcriptomic changes in circulating immune cells occurring within one week of embryo transfer have yet to be investigated. This study aimed to characterize the transcriptomic changes in peripheral blood leukocytes substantially earlier, on d 7 and 14 after embryo transfer. We hypothesized that immune-related genes are differentially expressed between pregnant and nonpregnant heifers and that these genes may provide insight into the mechanisms that promote immune tolerance to the embryo. These genes can potentially be biomarkers to predict pregnancy within the first 2 weeks after embryo transfer.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

This study is exempt from the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee as animals were not handled at our institution. Animals used in oocyte retrieval and embryo transfer are owned by ST Genetics, located in Vienna, Wisconsin, and Fond du Lac, Wisconsin.

Ovum Pickup (OPU)

Superovulated Holstein heifers housed together in one facility were used as oocyte donors. Ovum pickup (OPU) technique, or the transvaginal removal of the oocytes, was performed by guiding an ultrasound probe to locate and aspirate ovarian follicles (Callesen et al., 1987; Pieterse et al., 1988; Pieterse et al., 1991). OPUs were performed by the same veterinarian. The aspirated follicular fluid was searched for oocytes immediately.

In Vitro Production of Embryos

Embryos were generated through the in vitro fertilization (IVF) system at ST Genetics from May 2021 to August 2021. In brief, oocytes were aspirated from the follicles of donor heifers. The aspirated fluid was searched for cumulus-oocyte complexes (COCs) immediately following aspiration and scored as either viable or nonviable. Viable oocytes with at least one layer of cumulus cells were washed and placed into a maturation medium covered by mineral oil with cohorts grouped by the donor heifer. Following an 18–23 h incubation, the COCs were removed and placed into a fertiliza-

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

tion medium. There, complexes were stripped of the cumulus cells by pipetting. Conventional semen was prepared using the PureSperm 40/80 (https://nidacon.com/product/puresperm-40-80-2x20-ml/) method with slight adjustments to the protocol. Sperm was added to fresh fertilization media with the stripped oocytes. Gametes were co-incubated for 8 h. Presumptive zygotes were washed in a culture medium, transferred to a fresh culture medium, and cultured until d 7 of development. At d 7, embryos were morphologically assessed. Those that developed into the blastocyst stage were noted with a pronounced differentiation of the outer trophoblast layer and inner cell mass, as well as a prominent blastocele. Mid-blastocysts, expanded blastocysts, and hatched blastocysts of quality grades 1–2 (Bo and Mapletoft, 2013) were transferred into straws in preparation for the transfer into a recipient heifer.

Embryo Transfer

Estrus synchronized recipient cattle chosen for embryo transfer were all Holstein heifers (average 2 years old) housed in the same facility. The embryos produced were randomly assigned to a recipient heifer. A total of 170 heifers received embryos. Pregnancy was confirmed on d 28 via ultrasound. Heifers that experienced early embryonic loss before d 28 were recognized as nonpregnant.

Blood Collection

Within 24 h of the embryo transfer, blood samples were collected from the tail (coccygeal) vein in 9 mL EDTA blood collection tubes. This collection is denoted as Day 0 (D0). Blood was collected from the same heifers on d 7 (D7) and 14 (D14) post embryo transfer. The whole blood samples were centrifuged at 2,000 rpm for 20 min at 4°C within 24 h of the collection. The resulting buffy coat layer was transferred into fresh 1.5 mL microcentrifuge tubes. A 500 μL RNA-Later (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) was added to each buffy coat, and samples were stored at −20°C until further processing.

RNA Extraction and RNA Pooling

The buffy coat samples stored in RNA-Later were thawed at room temperature, then diluted 1:1 in PBS before RNA extraction (500 μL buffy coat: 500 μL PBS). The 1:1 diluted samples were spun at 5,000 x g for 5 min at room temperature to pellet the cells. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 1 mL TRIzol, mixed by pipetting, and incubated at room temperature for 5 min. Then, 200 μL chloroform was added to each sample and mixed by vigorously shaking. The samples were incubated at room temperature for 3 min and spun at 12,000 x g at 4°C for 15 min. Following this phase separation, the upper aqueous phase was transferred to a new 1.5 mL microcentrifuge tube. After, 500 μL of isopropanol was added, and samples were then incubated at 4°C for 10 min. The samples were spun at 12,000 x g at 4°C for 10 min. The supernatant was discarded and 1 mL freshly made 75% molecular grade ethanol was added. The samples were spun at 7,500 x g at 4°C for 5 min and the supernatant was discarded. The samples were dried at room temperature for 5 to 10 min to remove excess ethanol. The RNA was resuspended in 20 μL nuclease-free water (NFW).

The concentration of extracted RNA was quantified using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware). The RNA samples were normalized to 60 ng/μL using NFW and pooled for RNA sequencing. Pooled RNA samples were subjected to a DNase treatment using Ambion DNA-*free* DNase Treatment (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Samples were pooled based on the blood collection day and the pregnancy outcome. Samples were also pooled by the sire of the embryo transferred ensuring equal representation of the sires in the pregnant and nonpregnant groups. Each pool contained 6 to 7 individual RNA samples from different heifers. A total of 64 heifers were included in the sequencing pools (Supplementary Figure 1). A total of 30 pools were sequenced, where 15 represented the pregnant heifers and 15 were the nonpregnant heifers. Of the 15 pools from the pregnant heifers, 5 consisted of D0 collections, 5 were D7 collections, and 5 were D14 collections. Likewise, of the 15 pools from the nonpregnant heifers, 5 consisted of D0 collections, 5 were D7 collections, and 5 were D14 collections. The bulls used to fertilize the embryos for transfer were equally included in the pregnant and nonpregnant pools. The pools of RNA from pregnant heifers are denoted as PR, while the pools of RNA samples from nonpregnant heifers are denoted as NP.

Illumina Sequencing and Data Analysis

DNase-treated pooled RNA samples were sequenced by Admera Health (South Plainfield, NJ). Before library preparation, RNA quantity was checked using the Qubit RNA HS assay (Thermo Fisher Scientific). RNA quality was analyzed using the Bioanalyzer 2100 Eukaryote Total RNA Nano (Agilent Technologies, CA). RNA library preparation was performed using the Quant-seq 3′ RNaseq FWD kit (Lexogen, Vienna, Austria). Library concentration and quality were checked

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

using the Tapestation High Sensitivity D1000 Assay (Agilent Technologies). RNA integrity (RIN) numbers of all pools were from 7.4 to 9.4.

Sequencing was done with Illumina HiSeq X, generating 100 single-end reads to make 30 million single-end reads per sample. For each sample, FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) and Trimmomatic (Bolger et al., 2014) were used to check the quality of the raw reads and to trim adapter sequences and low-quality reads, respectively. Trimmed reads were then aligned to the bovine reference genome (Btau 5.0.1) using STAR (Dobin et al., 2013), including the "–quantMode GeneCounts" option to estimate gene counts. Only expressed genes with at least 15 counts in more than 5 samples were considered for each analysis. The R package "edgeR" was used to normalize the gene counts based on the trimmed mean of M-values (TMM) method (Robinson et al., 2010). Differential expression analyses were performed based on a negative binomial generalized linear model, including the sire groups as a blocking factor, using the edgeR package (Robinson et al., 2010). The statistical tests were corrected for multiple testing, so only genes with a false discovery rate (FDR) of less than 0.05 were considered significant (Benjamini and Hochberg, 1995). Fold difference in expression was calculated by the following: Fold Change $= 2^{\log 2FC}$, $\log_2 FC = \log_2$ fold change between the groups. The D0 and D14 pools were sequenced together in the same sequencing run. However, the D7 pools were sequenced within a different sequencing run, eliminating the opportunity for differential expression analysis of D0 and D7 since the source of variation, from the sequencing data or from biological differences, could not be determined.

Validation of RNA-Seq Using Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

Individual RNA samples, not included in the sequencing pools, were used for biological validation via RT-qPCR. Extracted RNAs were reverse transcribed into cDNA by the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). The reaction volume was 10 μL. Reverse transcriptase-PCR reactions were incubated at 25°C for 5 min, 46°C for 20 min, and then at 95°C for 1 min.

Gene expression analysis was done using the iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad). cDNA was diluted 1:6 with NFW, then combined with iTaq Universal SYBR Green supermix and the forward and reverse primers (Table 1). Specific forward and reverse primers were obtained from Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA). The RT-qPCR reactions were carried out in the Bio-Rad iCycler real-time PCR machine with the following cycling conditions: 95°C incubation for 30 s followed by 40 cycles of 95°C for 5 s and 59°C for 30 s, ending with an incubation at 65°C for 5 s and an incubation at 95°C for 5 s.

Statistical Analysis of RT-qPCR

To evaluate the RNA expression, cycle threshold (Ct) values were normalized to the endogenous housekeeping β-actin gene. The β-actin gene control was selected using NormFinder, which calculates expression stability. The mean and the range of the fold change for each RNA were calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$ using the estimated ΔΔCt value ± standard error following the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method by Livak and Schmittgen (2001). To compare the gene expression levels of pregnant and nonpregnant heifers on D7, data were analyzed with a *t*-test on the ΔCt values for each gene. To compare the gene expression levels of D0 and D14 collections from the same heifer, data were analyzed using a paired *t*-test on the ΔCt values for each gene.

RESULTS

Analysis of RNA-Seq Data

Differential expression analyses were performed in 5 different comparisons (Table 2). Analysis 1 compared

Table 1. RT-qPCR primer sequences of the differentially expressed genes

Gene	Forward Primer (5′-3′)	Reverse Primer (5′-3′)	Reference
B-actin*	CTGGACTTCGAGCAGGAGAT	GGATGTCGACGTCACACTTC	Gifford et al. (2007)
IFI6	CTCCTCCAAGATACGGTGACAA	TTTCGTCTTCCTCCTCGCAG	Peñagaricano et al. (2013)
ISG15	GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT	ACCTCCCTGCTGTCAAGGT	Gifford et al. (2007)
MX2	CTTCAGAGACGCCTCAGTCG	TGAAGCAGCCAGGAATAGTG	Gifford et al. (2007)
OAS1Y	ACCCTCTCCAGGAATCCAGT	GATTCTGGTCCCAGGTCTGA	Green et al. (2010)
IL1A	GCCTTCAATAACTGTGGAACCAAT	GTATATTTCAGGCTTGGTGAAAGGA	Rutigliano et al. (2022)
CCL4	AGCTGTGGTATTCCAGACCAA	TCAAGGTCATCCACGTACTCC	Magee et al. (2014)
CXCL3	GACAGTTCCTGAAAAGTGGT	ATAGTCCAGCACATCAAGTC	Islam et al. (2020)
EDN1	TCTGGACATCATCTGGGTCA	TTTGGTTGTTCCAGGCTTTC	Yamamoto et al. (2016)

*Housekeeping internal control.

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 2. Gene differential expression (DE) comparisons of peripheral blood leukocytes on d 0 (D0), d 7 (D7), and d 14 (D14) blood collections

Analysis	Comparison	Total Genes*	DE genes**
1	NP D7 vs. PR D7	11,413	13
2	PR D0 vs. PR D14	11,749	51
3	NP D14 vs. PR D14	11,709	0
4	NP D0 vs. PR D0	11,739	0
5	NP D0 vs. NP D14	11,674	26

NP = nonpregnant, PR = pregnant. *Total number of genes analyzed. **FDR < 5%.

the nonpregnant and pregnant heifers on D7, resulting in 13 differentially expressed genes (Supplementary Table 1). Analysis 2 compared the pregnant heifers on D0 to the same heifers on D14, where 51 genes were significantly differentially expressed (Supplementary Table 2). Differential expression analysis 3 compared the nonpregnant and pregnant animals on D14, showing zero differentially expressed genes. Differential expression analysis 4 compared the nonpregnant and pregnant groups on D0 or the day of the embryo transfer. This revealed zero differentially expressed genes. This comparison served as a control to ensure no significant expression differences between the 2 groups of heifers on the day of the embryo transfer. Differential expression analysis 5 compared the nonpregnant animals on D0 to D14, revealing 26 differentially expressed genes (Supplementary Table 3). This analysis also acted as a control to reduce the chance of identifying false positives or genes that may be differentially expressed on D14 unrelated to pregnancy.

Gene Expression Validation

Of the differentially expressed genes identified in analyses 1 and 2, 8 genes were selected for further quantification and validation. These genes were selected based on the FDR, fold difference in expression and the relevance to the immune response. The genes selected from analysis one include C-C motif chemokine ligand 4 (*CCL4*), Interleukin 1 A (*IL1A*), Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (*CXCL3*), and Expression of Endothelin 1 (*EDN1*) (Table 3). The genes selected from analysis 2 include Interferon α inducible protein 6 (*IFI6*), MX Dynamin-like GTPase 2 (*MX2*), 2'-5′-Oligoadenylate synthetase 1 (*OAS1Y*), and Interferon-stimulated gene 15 ubiquitin-like modifier (*ISG15*) (Table 4).

To validate the differentially expressed genes obtained by RNA sequencing, the 8 genes selected were further tested through RT-qPCR in new samples not included in the sequencing pools. For the comparison of pregnant and nonpregnant heifers on D7, the RNA of 28 individual heifers (14 pregnant and 14 nonpregnant) was analyzed (Figure 1A). *CCL4* expression was found to be upregulated in 13 of the 14 pregnant heifers compared with the nonpregnant heifers, with an average fold change of 29.60 ($P < 0.001$). *IL1A* expression was upregulated in 12 of the 14 pregnant heifers compared with the nonpregnant heifers, with an average fold change of 29.97 ($P < 0.001$). The expression of *CXCL3* was upregulated in all 14 pregnant heifers compared with the nonpregnant heifers with an average fold change of 18.12 ($P = 0.002$). For *EDN1*, expression was upregulated in 11 of the 14 pregnant heifers compared with the nonpregnant heifers with an average fold change of 8.10 ($P = 0.043$). Thus, the RT-qPCR results of these genes reported upregulation in the pregnant animals, supporting the RNA-sequencing results.

For the comparison of pregnant heifers on D0 collection compared with the same heifers on D14 after embryo transfer, the RNA of 14 heifers was analyzed (Figure 1B). *IFI6* was significantly upregulated in 13 of the 14 heifers on D14 compared with D0 with an average fold change of 3.08 ($P = 0.002$). *MX2* expression was significantly upregulated in 13 of the 14 heifers on D14 compared with D0 with an average fold change of 2.59 ($P < 0.001$). *OAS1Y* expression was significantly upregulated in all 14 of the heifers on D14 compared with D0 with an average fold change of 3.89 ($P < 0.001$), and *ISG15* expression was significantly upregulated in all 14 heifers on D14 compared with D0 with an average fold change of 5.09 ($P < 0.001$). The RT-qPCR

Table 3. Differential expression analysis of RNA-seq data comparing PR D7 and NP D7 of genes selected for further validation[1]

	Average normalized mean reads ± SD				
	PR Day 7	NP Day 7	Fold Difference in Expression	P-value	FDR
CCL4	51.01 ± 20.53	6.70 ± 1.65	7.31	<0.001	<0.001
IL1A	24.52 ± 20.08	2.66 ± 0.46	7.19	<0.001	0.006
CXCL3	77.40 ± 30.62	10.68 ± 6.25	7.61	<0.001	0.006
EDN1	5.25 ± 2.87	0.44 ± 0.24	10.63	<0.001	0.046

PR = pregnant, NP = nonpregnant, D7 = d 7 blood collection.

1 RNA-sequencing data from pooled RNA extracted from peripheral blood leukocytes of pregnant and nonpregnant heifers on day seven after embryo transfer.

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

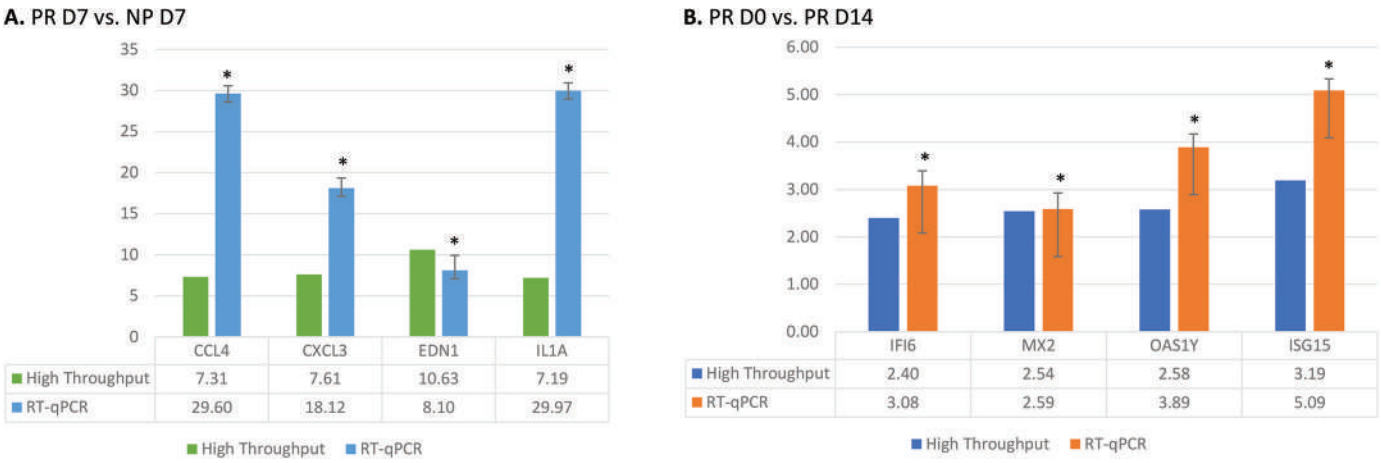


Figure 1. Comparative fold change (mean ± SEM) of high throughput RNA sequencing and RT-qPCR. * indicates significance ($P < 0.05$) of the RT-qPCR calculated fold change. A. PR D7 (n = 14) and NP D7 (n = 14) comparative fold change. B. PR D0 (n = 14) and PR D14 (n = 14) comparative fold change.

results of all 4 genes supported the RNA-sequencing results for D14 heifers.

DISCUSSION

During the first 2 weeks after embryo transfer, the bovine blastocyst hatches escaping from the zona pellucida, undergoing trophectoderm growth, elongation, and implants into the endometrial tissue toward the end of the second week after embryo transfer (Thomas, 2013; Brooks et al., 2014; Spencer et al., 2016). Our in vivo study characterizes the transcriptomic profiles of peripheral leukocytes of pregnant heifers during these first 2 weeks after embryo transfer. Our novel results showed that several genes were differentially expressed in the peripheral leukocytes of pregnant heifers as early as D7 and D14 post embryo transfer. Most of those differentially expressed genes were immune-related genes and ISGs. These findings suggest that the bovine embryo interacts with the circulating immune cells as early as D7 after embryo transfer to induce a state of tolerance essential for embryo development and survival.

Our results showed that *CCL4*, *IL1A*, *CXCL3*, and *EDN1*, and mRNA expressions were significantly upregulated in pregnant heifers at D7 post embryo transfer. *CCL4* and *CXCL3* are chemokines that regulate several biological functions, including angiogenesis, embryogenesis, and initiation of an immune response (Borroni et al., 2008). They play a crucial role in the communication at the conceptus-maternal interface, allowing the allogenic embryo to survive and ultimately implant into the endometrium (Borroni et al., 2008; Du et al., 2014; Zhang et al., 2022). In porcine, *CCL4* is vital in preparing the endometrium for pregnancy by activating implantation-related genes and recruiting macrophages to the implantation site (Borroni et al., 2008; Du et al., 2014). It has also been shown that *CCL4* stimulates trophoblast migration during implantation (Hannan et al., 2006). *CXCL3* is also reported to be associated with trophoblast migration, invasion, and proliferation (Gui et al., 2014; Wang et al., 2018). Studies have shown that both *CCL4* and *CXCL3* expressions were

Table 4. Differential expression analysis of RNA-seq data comparing PR D0 and PR 14 of genes selected for further validation[1]

	Average normalized mean reads ± SD				
	PR Day 0	PR Day 14	Fold Difference in Expression	P-value	FDR
IFI6	84.77 ± 28.92	196.97 ± 31.83	2.40	<0.001	<0.001
MX2	12.00 ± 3.16	30.27 ± 6.11	2.54	<0.001	<0.001
OAS1Y	48.38 ± 14.52	121.48 ± 17.54	2.58	<0.001	<0.001
ISG15	18.20 ± 8.90	53.90 ± 8.63	3.19	<0.001	0.006

PR = pregnant, D0 = d 0 blood collection, D14 = d 14 blood collection.

1 RNA-sequencing data from pooled RNA extracted from peripheral blood leukocytes of pregnant heifers on d 0 and d 14 after embryo transfer.

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

abnormal in women with preeclampsia, indicating their importance for proper implantation (Gui et al., 2014; Garrido-Gomez et al., 2017; Wang et al., 2018; Ren et al., 2022). Interleukin IL1A is a cytokine, a major immune regulator during pregnancy, regulating uterine receptivity, implantation, and fetal development (Dutta and Sengupta, 2017; Malik and Kanneganti, 2018). *EDN1* is a pleiotropic peptide that regulates vascularity and cell growth (Korth et al., 1999). It is known that inflammatory or immune factors in maternal circulation activate the endothelium, which increases the expression of *EDN1* in the peripheral blood (George and Granger, 2012; Galaviz-Hernandez et al., 2016).

The ability of circulating immune cells of pregnant heifers to express such immune-related genes on D7 post embryo transfer (onset of initiation of uterine receptivity to implantation; Brooks et al., 2014), together with their above-mentioned roles in the induction of implantation suggests that circulating immune cells recognize and react to the immune network to ensure the embryo implants in the uterus. Additionally, the lack of expression of these genes in circulating immune cells potentially serves as an early signal for implantation failure and subsequent early embryonic death. However, it is still obscure how such a minuscule embryo resident in the uterus can induce systemic immune responses in circulating blood cells during the first week after embryo transfer. It has been shown that the pre-hatching bovine embryo induces anti-inflammatory responses in the endometrial epithelium and local immune cells at the embryo-maternal interface (Talukder et al., 2020; Rashid et al., 2018). Additionally, immune cells, particularly PMNs, can amplify and transfer embryo signals into the extrauterine environment via a cell-to-cell communication mechanism (Fiorenza et al., 2021). Therefore, our results suggest that the presence of an embryo triggers anti-inflammatory responses locally at the uterine milieu and that the resident immune cells amplify and transfer embryo signals into the general circulation to tolerate this semi-allogeneic embryo.

Extending to the second week post embryo transfer (D14), our results showed that *IFI6*, *MX2*, *OAS1Y,* and *ISG15* genes were significantly upregulated in pregnant heifers compared with their levels in the same heifers on D0. Notably, these genes were also not significantly upregulated in the D14 samples of nonpregnant animals. *ISG15*, *MX2*, and *OAS1Y* are known as classical ISGs, where IFNT binds to receptors in the uterine epithelium, activating the JAK-STAT pathway, ultimately leading to the expression of these genes (Platanias, 2005; Chaney et al., 2021). The D7 bovine embryo secretes minute amounts of IFNT into the uterine lumen, which triggers ISG expression in endometrial epithelium for embryo tolerance at the embryo-maternal interface (Talukder et al., 2020; Rashid et al., 2018). Later, IFNT infiltrates into the circulation during the conceptus elongation period (d 12–15) and reaches peak production around d 20 of pregnancy (Hansen et al., 2017), when apparent effects on circulating immune cells have been reported (Green et al., 2010; Rocha et al., 2020; Ferraz et al., 2021) as confirmed with the present study′s data. Similarly, Yoshino et al. found that expression levels of *ISG15* and *MX2* were considerably higher in peripheral blood leukocytes of pregnant cattle compared with the nonpregnant animals on D21 of pregnancy (Yoshino et al., 2020, 2023). Ferraz et al. found increased expression of *ISG15* in the PBMCs of pregnant Holstein cows at D20 post-AI (Ferraz et al., 2021). *OAS1* expression has also been reported to be upregulated during d 15 to 18 in pregnant heifers (Green et al., 2010). *IFI6* is also an ISG that functions in immunomodulation (Sajid et al., 2021; Villamayor et al., 2023). It has been previously reported that *IFI6* was upregulated in the peripheral circulation of pregnant women (Wright et al., 2023). Additionally, Rocha et al. (2020) identified *IFI6* expression to be significantly upregulated in the peripheral bovine immune cells (PBMC and PMN) as early as D18 post-AI in beef heifers. Previously, it has been reported that ISGs were upregulated in the circulating PBMCs and PMNs as early as D7 of pregnancy in cows with multiple embryos (Talukder et al., 2019). Together, it seems that the ability of bovine embryos to trigger immune responses in circulating immune cells is dependent on embryo proliferation and subsequent levels of embryo-derived IFNT infiltrated into general circulation.

However, our differential expression analysis 3 revealed that ISGs were not differentially expressed in nonpregnant heifers compared with pregnant heifers on D14 post embryo transfer. Similarly, Yoshino et al. reported no differences in ISG expression in pregnant cows on D21 compared with nonpregnant cows that experienced late embryonic death (Yoshino et al., 2020; Yoshino et al., 2023). Therefore, we suggest that analyzing ISG expression in blood cells on D14 post embryo transfer serves as a potential biomarker for early detection of those animals that failed to conceive as well as the relative progress of gestation in pregnant animals.

This is the first reported study to characterize circulating transcriptomic changes as early as one week after embryo transfer. However, one limitation of this study was the inability to compare the D7 collections to the D0 and D14 collections. The ability to analyze the pregnancy-related transcriptomic changes from heifers on the day of embryo transfer (D0) to one week later (D7) can provide additional information on how circulating leukocyte gene expression changes within the first week of embryonic development post-transfer.

CONCLUSIONS

This study provides in vivo evidence for the transcriptomic changes in circulating leukocytes that occur 1–2 weeks after embryo transfer in dairy cattle. Several immune-related genes and ISGs were activated during this period, which may provide clues to how the immune system accommodates the allogenic conceptus to survive and evade immune system rejection. To further investigate the diagnostic potentials of the genes identified in this study, additional studies are warranted to analyze the specificity and sensitivity of these biomarkers to predict early pregnancy in individual cows.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a USDA Hatch Act Formula Fund WIS03061 from the University of Wisconsin, Madison. The authors thank Pablo Ross, David Kendall, Alan Mileham, and ST-Genetics-Wisconsin veterinarians for providing blood samples and pregnancy outcome data.

REFERENCES

Balhara, A. K., M. Gupta, S. Singh, A. K. Mohanty, and I. Singh. 2013. Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. ScientificWorldJournal 958540:1–10. https://doi.org/10.1155/2013/958540.

Basavaraja, R., J. N. Drum, J. Sapuleni, L. Bibi, G. Friedlander, S. Kumar, R. Sartori, and R. Meidan. 2021. Downregulated luteolytic pathways in the transcriptome of early pregnancy bovine corpus luteum are mimicked by interferon-tau in vitro. BMC Genomics 22:452. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07747-3.

Basavaraja, R., S. T. Madusanka, J. N. Drum, K. Shrestha, S. Farberov, M. C. Wiltbank, R. Sartori, and R. Meidan. 2019. Interferon-Tau Exerts Direct Prosurvival and Antiapoptotic Actions in Luteinized Bovine Granulosa Cells. Sci. Rep. 9:14682. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51152-6.

Bazer, F. W. 2013. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. J. Anim. Sci. Biotechnol. 4:23. https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-23.

Benjamini, Y., and Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J. R. Stat. Soc. B 57:289–300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.

Bo, G. A., and R. J. Mapletoft. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. Anim. Reprod. 10:344–348.

Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170.

Borroni, E. M., R. Bonecchi, C. Buracchi, B. Savino, A. Mantovani, and M. Locati. 2008. Chemokine decoy receptors: New players in reproductive immunology. Immunol. Invest. 37:483–397. https://doi.org/10.1080/08820130802191318.

Bridi, A., K. Bertolin, V. B. Rissi, L. K. S. Mujica, W. G. Glanzner, M. P. de Macedo, F. V. Comim, P. B. D. Gonçalves, and A. Q. Antoniazzi. 2018. Parthenogenetic bovine embryos secrete type I interferon capable of stimulating ISG15 in luteal cell culture. Anim. Reprod. 15:1268–1277. https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0095.

Brooks, K., G. Burns, and T. E. Spencer. 2014. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. J. Anim. Sci. Biotechnol. 5:53. https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-53.

Callesen, H., T. Greve, and F. Christensen. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. Theriogenology 27:217. https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90094-X.

Chaney, H., L. Grose, G. Charpigny, S. Behura, M. Sheldon, J. Cronin, P. Lonergan, T. Spencer, and D. Matthew. 2021. Conceptus-induced, interferon tau-dependent gene expression in bovine endometrial epithelial and stromal cells. Biol. Reprod. 104:669–683. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa226.

De Los Santos, J. A., Andrade, J. P. N., Cangiano, L. R., Iriarte, A., Peñagaricano, F., & Parrish, J. J. 2023. Transcriptomic analysis reveals gene expression changes in peripheral white blood cells of cows after embryo transfer: Implications for pregnancy tolerance. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, https://doi.org/10.1111/rda.14371. Advance online publication. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.14371

Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. R. Gingeras. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29:15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635.

Du, M. R., S. C. Wang, and D. J. Li. 2014. The integrative roles of chemokines at the maternal–fetal interface in early pregnancy. Cell. Mol. Immunol. 11:438–448. https://doi.org/10.1038/cmi.2014.68.

Dutta, S., and P. Sengupta. 2017. Defining pregnancy phases with cytokine shift. J. Pregnancy 1. https://doi.org/10.15761/JPR.1000124.

Ferraz, P. A., C. A. S. G. Filho, C. C. Rocha, A. L. Neto, G. de Andrade Bruni, T. S. I. Oshiro, P. S. Baruselli, F. S. Lima, and G. Pugliesi. 2021. Feasibility and accuracy of using different methods to detect pregnancy by conceptus-stimulated genes in dairy cattle. JDS Commun. 2:153–158. https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-0062.

Filho, R., G. A. Franco, S. T. Reese, F. G. Dantas, P. Fontes, R. F. Cooke, J. D. Rhinehart, K. W. Thompson, and K. G. Pohler. 2020. Using pregnancy associated glycoproteins (PAG) for pregnancy detection at day 24 of gestation in beef cattle. Theriogenology 141:128–133. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.014.

Fiorenza, M. F., M. A. Marey, M. B. Rashid, M. A. Zinnah, D. Ma, V. A. Morillo, K. Kusama, M. Shimada, K. Imakawa, A. Q. Antoniazzi, and A. Miyamoto. 2021. Neutrophils recognize and amplify IFNT signals derived from day 7 bovine embryo for stimulation of ISGs expression in vitro: A possible implication for the early maternal recognition of pregnancy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 553:37–43. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.03.037.

Gajewski, Z., M. Pertajitis, N. Sousa, J. Beckers, B. Pawliński, and F. Janett. 2009. Pregnancy - associated glycoproteins as a new diagnostic tool in cattle reproduction. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 151:577–582. https://doi.org/10.1024/0036-7281.151.12.577.

Galaviz-Hernandez, C., E. Arámbula-Meraz, D. Medina-Bastidas, M. Sosa-Macías, B. P. Lazalde-Ramos, M. Ortega-Chávez, and L. Hernandez-García. 2016. The paternal polymorphism rs5370 in the EDN1 gene decreases the risk of preeclampsia. Pregnancy Hypertens. 6:327–332. https://doi.org/10.1016/j.preghy.2016.07.002.

Garrido-Gomez, T., K. Ona, M. Kapidzic, M. Gormley, C. Simon, O. Genbacev, and S. Fisher. 2017. Severe pre-eclampsia is associated with alterations in cytotrophoblasts of the smooth chorion. The Company of Biologists 144:767–777.

George, E. M., and J. P. Granger. 2012. Linking placental ischemia and hypertension in preeclampsia. Hypertension 60:507–511. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.194845.

Gifford, C. A., B. H. Aloqaily, and J. A. Hernandez Gifford. 2019. BEEF SPECIES-RUMINANT NUTRITION CACTUS BEEF SYMPOSIUM: Maternal immune modulation prior to embryo arrival in the uterus is important for establishment of pregnancy in cattle1. J. Anim. Sci. 97:3605–3610. https://doi.org/10.1093/jas/skz160.

Gifford, C. A., K. Racicot, D. S. Clark, K. J. Austin, T. R. Hansen, M. C. Lucy, C. J. Davies, and T. L. Ott. 2007. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

and bred, nonpregnant dairy cows. J. Dairy Sci. 90:274–280. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72628-0.

Green, J. C., C. S. Okamura, S. E. Poock, and M. C. Lucy. 2010. Measurement of interferon-tau (IFN-tau) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18–20d after insemination in dairy cattle. Anim. Reprod. Sci. 121:24–33. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.05.010.

Gui, S., S. Ni, J. Jia, Y. Gong, L. Gao, L. Zhang, and R. Zhou. 2014. Inconformity of CXCL3 plasma level and placenta expression in preeclampsia and its effect on trophoblast viability and invasion. PLoS One 9:e114408. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114408.

Hannan, N., R. Jones, C. White, and L. Salamonsen. 2006. The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the feto-maternal interface. Biol. Reprod. 74:896–904. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045518.

Hansen, T. R., L. D. P. Sinedino, and T. E. Spencer. 2017. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). Reproduction 154:F45–F59. https://doi.org/10.1530/REP-17-0315.

Hirayama, H., S. Moriyasu, S. Kageyama, K. Sawai, H. Takahashi, M. Geshi, T. Fujii, T. Koyama, K. Koyama, A. Miyamoto, M. Matsui, and A. Minamihashi. 2014. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. Theriogenology 81:1108–1115. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.039.

Islam, M. A., M. Takagi, K. Fukuyama, R. Komatsu, L. Albarracin, T. Nochi, Y. Suda, W. Ikeda-Ohtsubo, V. Rutten, W. V. Eden, J. Villena, H. Aso, and H. Kitazawa. 2020. Transcriptome Analysis of The Inflammatory Responses of Bovine Mammary Epithelial Cells: Exploring Immunomodulatory Target Genes for Bovine Mastitis. Pathogens 9:200. https://doi.org/10.3390/pathogens9030200.

Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, and K. Grende. 2020. Endometrial expression of various genes (ISGs, PPARs, RXRs and MUC1) on day 16 post-ovulation in repeat breeder cows, with or without subclinical endometritis. Theriogenology 145:251–259. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.036.

Korth, P., R. M. Bohle, P. Corvol, and F. Pinet. 1999. Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. J. Histochem. Cytochem. 47:447–461. https://doi.org/10.1177/002215549904700403.

Kowalczyk, A., E. Czerniawska-Piątkowska, and M. Wrzecińska. 2021. The Importance of Interferon-Tau in the Diagnosis of Pregnancy. BioMed Res. Int. 9915814:1–6. https://doi.org/10.1155/2021/9915814.

Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods 25:402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

Magee, D. A., K. M. Conlon, N. C. Nalpas, J. A. Browne, C. Pirson, C. Healy, K. E. McLoughlin, J. Chen, H. M. Vordermeier, E. Gormley, D. E. MacHugh, and S. V. Gordon. 2014. Innate cytokine profiling of bovine alveolar macrophages reveals commonalities and divergence in the response to Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis infection. Tuberculosis (Edinb.) 94:441–450. https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.04.004.

Malik, A., and T. D. Kanneganti. 2018. Function and regulation of IL-1α in inflammatory diseases and cancer. Immunol. Rev. 281:124–137. https://doi.org/10.1111/imr.12615.

Mishra. S.R. and Sarkar, M. 2018. Interferon stimulated genes (ISGs): Novel pregnancy specific biomarker in buffaloes (Bubalus bubalis). *Journal of Immunological Sciences*.

Oliveira, Lj., R. S. N. Barreto, F. Perecin, N. Mansouri-Attia, F. T. V. Pereira, and F. V. Meirelles. 2012. Modulation of maternal immune system during pregnancy in the cow. Reprod. Domest. Anim. 47(s4):384–393. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02102.x.

Peñagaricano, F., A. H. Souza, P. D. Carvalho, A. M. Driver, R. Gambra, J. Kropp, K. S. Hackbart, D. Luchini, R. D. Shaver, M. C. Wiltbank, and H. Khatib. 2013. Effect of maternal methionine supplementation on the transcriptome of bovine preimplantation embryos. PLoS One 8:e72302. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072302.

Pieterse, M. C., K. A. Kappen, Th. A. M. Kruip, and M. A. M. Taverne. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology 30:751–762. https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90310-X.

Pieterse, M. C., P. L. Vos, T. A. Kruip, Y. A. Wurth, T. H. van Beneden, A. H. Willemse, and M. A. Taverne. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. Theriogenology 35:857–862. https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90426-E.

Platanias, L. C. 2005. Mechanisms of type-1 and type-II interferon-mediated signaling. Nat. Rev. Immunol. 5:375–386. https://doi.org/10.1038/nri1604.

Pohler, K.G., Franco, G.A., Reese, S.T., Dantas, F.G., Ellis, M.D., & Payton, R.R. 2016. Past, present and future of pregnancy detection methods. Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. (367–376).

Ramu, S., C. Stamatkin, L. Timms, M. Ruble, R. G. Roussev, and E. R. Barnea. 2013. PreImplantation factor (PIF) detection in maternal circulation in early pregnancy correlates with live birth (bovine model). Reproductive biology and endocrinology. Reprod. Biol. Endocrinol. 11:105. https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-105.

Rani, M. R., J. Shrock, S. Appachi, R. A. Rudick, B. R. Williams, and R. M. Ransohoff. 2007. Novel interferon-beta-induced gene expression in peripheral blood cells. J. Leukoc. Biol. 82:1353–1360. https://doi.org/10.1189/jlb.0507273.

Rashid, M. B., A. K. Talukder, K. Kusama, S. Haneda, T. Takedomi, H. Yoshino, S. Moriyasu, M. Matsui, M. Shimada, K. Imakawa, and A. Miyamoto. 2018. Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vivo generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 500:879–884. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.178.

Ren, J., Y. Zhang, J. Jia, L. Dai, Y. Wang, B. Zhou, and R. Zhou. 2022. Relationship between polymorphisms of CXCL3 gene and preeclampsia. J. Matern. Fetal Neonatal Med. 35:258–262. https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1716332.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616.

Rocha, C. C., S. C. da Silva Andrade, G. D. de Melo, I. G. Motta, L. L. Coutinho, A. M. Gonella-Diaza, M. Binelli, and G. Pugliesi. 2020. Early pregnancy-induced transcripts in peripheral blood immune cells in bos indicus heifers. Sci. Rep. 10:10. https://doi.org/10.1038/s41598-020-70616-8.

Rutigliano, H. M., Thomas, A. J., Umbaugh, J. J., Wilhelm, A., Sessions, B. R., Kaundal, R., Duhan, N., Hicks, B. A., Schlafer, D. H., White, K. L., & Davies, C. J. 2022. Increased expression of pro-inflammatory cytokines at the fetal-maternal interface in bovine pregnancies produced by cloning. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989), 87*(3), e13520. https://doi.org/10.1111/aji.13520

Sajid, M., H. Ullah, K. Yan, M. He, J. Feng, M. A. Shereen, R. Hao, Q. Li, D. Guo, Y. Chen, and L. Zhou. 2021. The functional and antiviral activity of interferon alpha-inducible IFI6 against hepatitis B virus replication and gene expression. Front. Immunol. 12:634937. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.634937.

Spencer, T. E., N. Forde, and P. Lonergan. 2016. Insights into conceptus elongation and establishment of pregnancy in ruminants. Reprod. Fertil. Dev. 29:84–100. https://doi.org/10.1071/RD16359.

Talukder, A. K., M. A. Marey, K. Shirasuna, K. Kusama, M. Shimada, K. Imakawa, and A. Miyamoto. 2020. Roadmap to pregnancy in the first 7 days post-insemination in the cow: Immune crosstalk in the corpus luteum, oviduct, and uterus. Theriogenology 150:313–320. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.071.

Talukder, A. K., Rashid, M. B., Takedomi, T., Moriyasu, S., Imakawa, K., & Miyamoto, A. 2019. Day-7 embryos generate an anti-inflammatory immune response in peripheral blood immune cells in superovulated cows. American journal of reproductive immunology

ARTICLE IN PRESS—UNCORRECTED PROOF
Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

(New York, N.Y.: 1989), 81(2), e13069. https://doi.org/10.1111/aji.13069

Temesgen, M. Y., A. A. Assen, T. T. Gizaw, B. A. Minalu, and A. Y. Mersha. 2022. Factors affecting calving to conception interval (days open) in dairy cows located at Dessie and Kombolcha towns, Ethiopia. PLoS One 17:e0264029. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264029.

Thomas, E. S. 2013. Early pregnancy: Concepts, challenges, and potential solutions. Anim. Front. 3:48–55. https://doi.org/10.2527/af.2013-0033.

Toji, N., Shigeno, S., Kizaki, K., Koshi, K., Matsuda, H., Hashiyada, Y., Imai, K., Takahashi, T., Ishiguro-Oonuma, T., & Hashizume, K. 2017. Evaluation of interferon-stimulated genes in peripheral blood granulocytes as sensitive responders to bovine early conceptus signals. *Veterinary journal (London, England: 1997), 229*, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.007

Villamayor, L., V. Rivero, D. López-García, D. J. Topham, L. Martínez-Sobrido, A. Nogales, and M. L. DeDiego. 2023. Interferon alpha inducible protein 6 is a negative regulator of innate immune responses by modulating RIG-I activation. Front. Immunol. 14:1105309. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1105309.

Wallace, R. M., K. G. Pohler, M. F. Smith, and J. A. Green. 2015. Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. Reproduction 149:R115–R126. https://doi.org/10.1530/REP-14-0485.

Wang, H., T. Wang, L. Dai, W. Cao, L. Ye, L. Gao, B. Zhou, and R. Zhou. 2018. Effects of CXCL3 on migration, invasion, proliferation and tube formation of trophoblast cells. Placenta 66:47–56. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.05.004.

Wonfor, R. E., C. J. Creevey, M. Natoli, M. Hegarty, D. M. Nash, and M. T. Rose. 2020. Interaction of preimplantation factor with the global bovine endometrial transcriptome. PLoS One 15:e0242874. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242874.

Wright, M., D. E. Goin, M. K. Smed, N. P. Jewell, J. L. Nelson, J. Olsen, M. L. Hetland, V. Zoffmann, and D. Jawaheer. 2023. Pregnancy-associated systemic gene expression comparedto prepregnancy baseline, among healthy women with term pregnancies. Front. Immunol. 14:1161084. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161084.

Yamamoto, Y., M. Kohka, Y. Kobayashi, I. Woclawek-Potocka, and K. Okuda. 2016. Endothelin as a local regulating factor in the bovine oviduct. Reprod. Fertil. Dev. 28:673–681. https://doi.org/10.1071/RD14076.

Yoshino, H., K. Kizaki, T. Hirata, K. Iga, H. Matsuda, T. Yamanouchi, Y. Hashiyada, K. Imai, T. Ishiguro-Oonuma, T. Kanazawa, T. Takahashi, and K. Hashizume. 2023. Interferon-stimulated gene expression in peripheral blood leucocytes as a convenient prediction marker for embryo status in embryo-transferred Japanese Black Cows during the peri-implantation period. Vet. Sci. 10:408. https://doi.org/10.3390/vetsci10070408.

Yoshino, H., K. Kizaki, K. Iga, T. Hirata, H. Matsuda, T. Yamanouchi, Y. Hashiyada, N. Toji, T. Ishiguro-oonuma, T. Takahashi, and K. Hashizume. 2020. Use of a prediction method for early pregnancy status utilizing receiver operating characteristic curve analysis of peripheral blood leukocyte interferon-stimulated genes in Japanese-black cattle. Anim. Reprod. Sci. 214:106283. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106283.

Zhang, S., J. Ding, Y. Zhang, S. Liu, J. Yang, and T. Yin. 2022. Regulation and function of chemokines at the maternal interface. Front. Cell Dev. Biol. 10:826053. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826053.

Zoli, A. P., P. Demez, J. F. Beckers, M. Reznik, and A. Beckers. 1992. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placentome. Biol. Reprod. 46:623–629. https://doi.org/10.1095/biolreprod46.4.623.

ORCIDS

A. Strangstalien https://orcid.org/0000-0002-2544-3700
C. U. Braz https://orcid.org/0000-0002-5474-1010
M. Marey https://orcid.org/0000-0002-7545-327X
H. Khatib https://orcid.org/0000-0003-1312-1453

Journal of Animal Science, 2022, **100**, 01–17
https://doi.org/10.1093/jas/skac091
Advance access publication 1 July 2022
Featured Article

Bioactive supplements influencing bovine in vitro embryo development

Lydia K. Wooldridge,[†,1] Jessica A. Keane,[†] Michelle L. Rhoads,[†] and Alan D. Ealy[†,2]

[†]Department of Animal and Poultry Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA
[1]Present address: Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, ME 04609, USA
[2]Corresponding author: ealy@vt.edu

Abstract

Ovum pickup and in vitro production (**IVP**) of bovine embryos are replacing traditional multiple ovulation embryo transfer (**MOET**) as the primary means for generating transferable embryos from genetically elite sires and dams. However, inefficiencies in the IVP process limit the opportunities to produce large numbers of transferable embryos. Also, the post-transfer competency of IVP embryos is inferior to embryos produced by artificial insemination or MOET. Numerous maternal, paternal, embryonic, and culture-related factors can have adverse effects on IVP success. This review will explore the various efforts made on describing how IVP embryo development and post-transfer competency may be improved by supplementing hormones, growth factors, cytokines, steroids and other bioactive factors found in the oviduct and uterus during early pregnancy. More than 40 of these factors, collectively termed as embryokines, are reviewed here. Several embryokines contain abilities to promote embryo development, including improving embryo survivability, improving blastomere cell numbers, and altering the distribution of blastomere cell types in blastocysts. A select few embryokines also can benefit pregnancy retention after IVP embryo transfer and improve neonatal calf health and performance, although very few embryokine-supplemented embryo transfer studies have been completed. Also, supplementing several embryokines at the same time holds promise for improving IVP embryo development and competency. However, more work is needed to explore the post-transfer consequences of adding these putative embryokines for any adverse outcomes, such as large offspring syndrome and poor postnatal health, and to specify the specific embryokine combinations that will best represent the ideal conditions found in the oviduct and uterus.

Lay Summary

Ovum pickup and in-vitro production (**IVP**) of bovine embryos have quickly become commercial options for generating large quantities of transferable bovine embryos from genetically elite sires and dams. However, 2 limitations in this process still exist. First, the percentage of eggs/oocytes that become fertilized and produce transferable embryos remains low. Second, IVP embryos that are transferred to recipients are less able to maintain a viable pregnancy than embryo produced by other means. Various maternal, paternal, embryonic, and culture-related factors will influence IVP success. This review describes how both IVP embryo development and post-transfer embryo competency may be improved by supplementing hormones, growth factors, cytokines, steroids, and other bioactive factors found in the oviduct and uterus during early pregnancy. These factors are collectively termed as embryokines. Several embryokines will promote IVP embryo development, but only a few of these embryokines have been tested for their ability to improve post-embryo transfer pregnancy retention. More work is needed to explore the post-transfer consequences of adding embryokines. However, with that being said, all indications are that we are on the right track with identifying one and likely several embryokines that will improve IVP embryo development and post-transfer pregnancy retention in cattle.

Key words: cytokines, embryokines, embryo development, growth factors

Abbreviations: ACTA, activin A; AI, artificial insemination; AKT, Ak strain transforming; BMP, bone morphogenetic protein; CNTF, ciliary neurotropic factor; CTGF, connective tissue growth factor; CSF, colony-stimulating factor; CSF2RA, colony-stimulating factor 2 receptor alpha; CSF2RB, colony-stimulating factor 2 receptor beta; DHA, docosahexaenoic acid; DKK1, Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1; E2, estradiol 17 beta; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; ET, embryo transfer; FBS, fetal bovine serum; FGF, fibroblast growth factor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; FST, follistatin; GDF, growth differentiation factor; GH, growth hormone; GHR, growth hormone receptor; HA, hyaluronic acid; HDGF, hepatoma-derived growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; IGF, insulin-like growth factor; IGF1R, insulin-like growth factor 1 receptor; ICM, inner cell mass; IFN, interferon; IFNT, interferon-tau; IL, interleukin; IL1B, interleukin-1 beta; IL6R, interleukin 6 receptor; IL6ST, interleukin 6 signal transducer; IVP, in vitro produced; JAK, Janus kinase; LA, linoleic acid; LIF, leukemia inhibitory factor; LIFR, leukemia inhibitory factor receptor; LPA, lysophosphatidic acid; LPAR, lysophosphatidic acid receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MOET, multiple ovulation embryo transfer; MT, melatonin; MTNR1A, melatonin receptor 1A; MTNR1B, melatonin receptor 1B; NCL, nucleolin; NFkB, nuclear factor kappa B; NGF, nerve growth factor; OSM, oncostatin-M; P4, progesterone; PDGF, platelet-derived growth factor; PrE, primitive endoderm; PGE2, prostaglandin E2; PGF2, prostaglandin F2 alpha; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PPARD, peroxisome proliferator-activated receptor delta; PPARG, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; PUFA, polyunsaturated fatty acid; RAR, retinoic acid receptor; ROS, reactive oxygen species; RXR, retinoic acid receptor X; SCF, stem cell factor; SMAD, small mothers against decapentaplegic; STAT, signal transducer and activator of transcription; T_3, triiodothyronine; T_4, thyroxin; TE, trophectoderm; TDGF1, teratocarcinoma-derived growth factor 1; TGF, transforming growth factor; TGFA, transforming growth factorα; TGFB, transforming growth factor β; TNF, tumor necrosis factor; TNFA, tumor necrosis factor alpha; WNT, wingless-related integration; VEGFA, vascular endothelial growth factor A

Received February 5, 2022 Accepted March 21, 2022.

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of the American Society of Animal Science. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

Introduction

There has been a rapid growth in the use of in vitro fertilization and embryo culture for embryo production in cattle in the past few years. Over 1 million in vitro produced (**IVP**) bovine embryos were produced throughout the world in 2019 (Viana, 2019). Approximately 90% of embryos were produced in North and South America from oocytes harvested through ovum pickup (Viana, 2019). Ovum pickup and IVP are attractive alternatives to multiple ovulation and embryo transfer (**ET**) because of increases in embryo yields as well as the ability to harvest oocytes from pre-pubertal heifers and pregnant dams. However, notable inefficiencies exist for IVP embryos, where only 20% to 40% of oocytes will produce transferable embryos and only 30% to 40% of transferred IVP embryos produce a calf (reviewed in Ealy et al., 2019; Hansen, 2020).

Various factors affect the success of IVP embryos, including maternal/paternal factors (e.g., fertility of recipient), embryonic factors (e.g., aneuploidies/mixoploidies, genetics of embryo, and donor health history), and in vitro culture factors (e.g., exposure to light, culture medium composition, and fluctuating temperatures; Ealy et al., 2019; Hansen, 2020). One focal point in bovine IVP embryo research has been to improve in vitro embryo culture conditions. Embryo-based media formations contain salts, energy sources (lactate, pyruvate, phosphate, glucose, and amino acids), and a macromolecule source (traditionally bovine serum albumin or fetal bovine serum). Most culture conditions are static, allowing embryos to remain in the same medium droplet from the zygote to blastocyst stage. Also, most embryo media formulations do not contain any of the various enzymes, extracellular vesicles, and micronutrients found in the oviduct and uterus during the period of early embryo development. These media formulations are also devoid of hormones, cytokines, and growth factors found in the oviduct and uterus during the first 7 to 8 da post-estrus (Martins et al., 2018; Tribulo et al., 2018b). Many of these bioactive factors are often defined as embryotrophic factors or embryokines because of their ability to facilitate early embryo development. Supplementation with fetal bovine serum (**FBS**) may partially compensate for the lack of some of these embryokines; however, this is not ideal since FBS composition may vary from batch to batch. Also, although many of the factors that influenced large offspring syndrome in the past have been overcome, there may still be some residual influences of FBS supplementation on calf size (Rivera, 2019; Siqueira et al., 2019). A preferred way to simulate the oviductal and uterine environments is to develop a defined combination of embryokines that will promote in vitro embryo development as closely as possible to what would normally occur in the reproductive tract.

This review will focus on describing how embryo culture media can be modified so it contains embryokines that encourage "normal" embryogenesis. More than 40 presumptive embryokines have been studied over the past 3 decades for their ability to improve in vitro bovine embryo culture systems. This review will describe how many of these embryokines influence blastocyst formation, embryo quality, and embryonic cell number and apoptosis. Also, when information exists, we will describe how supplementation with certain factors before ET influences pregnancy retention and neonatal and postnatal calf health. The review also contains insights into using embryokine cocktails during embryo culture. Descriptions and citations for each factor included in this manuscript are provided in Supplementary Tables S1 and S2.

Insulin and Insulin-Like Growth Factors

The origins in exploring insulin as an embryokine likely stemmed from the inclusion of insulin as a survival factor in serum-free media formations in somatic cell culture systems. In contrast, the inclusion of insulin-like growth factors (**IGF**) 1 and 2 likely emerged because of definitive associations with embryogenesis in multiple mammals. Both IGF1 and IGF2 are well known for their involvement with organismal growth and development. Mice with null mutations of either *Igf1* or *Igf2* are smaller than their wild-type littermates and exhibit organ hypoplasia, delays in bone ossification, and central nervous system abnormalities (Baker et al., 1993, 1996; Liu et al., 1993). Conversely, either IGF1 or IGF2 overexpression, which sometimes occurs from a loss of imprinting in IVP embryos, increases body weight and can result in Beckwith–Wiedmann syndrome in humans and large offspring syndrome in cattle (Mathews et al., 1988; Smith et al., 2015). Both are overgrowth syndromes characterized by macrosomia.

Insulin

Insulin has been supplemented to IVP bovine embryos at a large range of concentrations (from 1 pg/mL to 100 µg/mL). There are a few reports indicating that insulin supplementation will decrease blastomere apoptosis (Byrne et al., 2002; Wydooghe et al., 2014), but in general insulin did not influence blastocyst formation or cell number (Matsui et al., 1995; Mihalik et al., 2000; Byrne et al., 2002; Wydooghe et al., 2014). A few studies detected an increase in blastocyst production after combining insulin treatment with glucose supplementation (Liu et al., 1995; Augustin et al., 2003), although another group failed to detect a benefit from this treatment combination (Byrne et al., 2002). The requirement of glucose for an effect of insulin is plausible, as insulin's primary function is to stimulate glucose uptake by cells (Tokarz et al., 2018), and insulin may be especially important at the blastocyst stage when trophectoderm (**TE**) cells begin utilizing glucose (Thompson et al., 1996; Khurana and Niemann, 2000). Again, however, there are disparate reports for whether insulin supplementation improves blastocyst cell numbers (Matsui et al., 1995; Byrne et al., 2002; Augustin et al., 2003). Ultimately, the benefits of insulin in embryo culture media remains unclear, but it seems as though other embryokines deserve greater attention when formulating media supplements that can maximize in vitro bovine embryo production.

Insulin-Like Growth Factors

Both IGF1 and IGF2 are produced by the bovine oviduct and uterus in the early diestrus period (Geisert et al., 1991; Robinson et al., 2000; Pushpakumara et al., 2002; Rhoads et al., 2008; Tribulo et al., 2018b), and preimplantation bovine embryos contain transcripts for *IGF1* and *IGF2* and for the IGF1 receptor, *IGF1R*, which can cross-react with both IGF1 and IGF2 (Schultz et al., 1992; Yaseen et al., 2001; Wang et al., 2009).

Effects of IGF1 on bovine IVP embryos have been studied extensively over the past 3 decades. Work has found that IGF1 is necessary for optimal in vitro bovine embryo production given that knockdown of IGF1R reduces blastocyst development (Wang et al., 2009). However, it remains unclear

if IGF1 supplementation improves blastocyst production. We identified 25 published studies that examined the effects of IGF1 supplementation in IVP bovine embryos (Herrler et al., 1992; Larson et al., 1992a; Flood et al., 1993; Lee and Fukui, 1995; Matsui et al., 1995; Palma et al., 1997; Prelle et al., 2001; Byrne et al., 2002; Makarevich and Markkula, 2002; Moreira et al., 2002; Block et al., 2003, 2008; Sirisathien and Brackett, 2003; Sirisathien et al., 2003b; Jousan and Hansen, 2004, 2007; Dhali et al., 2009; Loureiro et al., 2009; Moss et al., 2009; Neira et al., 2010; Bonilla et al., 2011b; Sakagami et al., 2012; Ahumada et al., 2013; Kocyigit and Cevik, 2015; Xie et al., 2017; Tribulo et al., 2018a; Stoecklein et al., 2021). Approximately one-half of these studies detected increases in blastocyst formation following IGF1 supplementation. Several studies also showed a benefit of IGF1 on total cell number (Table 1). IGF1 utilizes a mitogen-activated protein kinase (**MAPK**) pathway to increase blastocyst cell number (Jousan and Hansen, 2007). The specific cell types that are influenced by IGF1 remain unclear. One report implicates the inner cell mass (**ICM**) as the main cell type that is influenced by IGF1 (Sirisathien and Brackett, 2003) while another study found that the **TE** was the primary cell responding to IGF1(Xie et al., 2017) and a third study found that both ICM and TE cell numbers were improved with IGF1 supplementation (Sakagami et al., 2012).

Arguably the greatest benefit that IGF1 has on bovine embryos occurs during periods of stress. There is evidence that IGF1 serves as an anti-apoptotic and survival factor in IVP bovine embryos under normal embryo culture conditions (Byrne et al., 2002; Makarevich and Markkula, 2002), and IGF1 alleviates reactive oxygen species (**ROS**) damage in bovine blastocysts (Moss et al., 2009). Moreover, IGF1 lessens the adverse effects of heat shock on apoptosis and blastocyst cell number (Jousan and Hansen, 2004; Jousan et al., 2008). This effect is controlled via IGF1 activation of the PI3 kinase pathway (Jousan and Hansen, 2007; Jousan et al., 2008; Bonilla et al., 2011a). Thus, there is clear evidence that IGF1 can serve as a thermoprotective factor in bovine embryos, and one of its main activities is to limit ROS damage.

A few studies have examined post-transfer outcomes of IGF1-treated embryos. Treatment with IGF1 before transfer may improve conceptus survival as early as day 14 post-estrus (Block et al., 2007), but improvements in pregnancy retention rates after ET could only be detected when ET was completed in summer months (Block et al., 2003; Loureiro et al., 2009). This provides additional credence to the notion that IGF1 serves as a survival factor in bovine IVP embryos.

The effects of IGF2 supplementation on IVP bovine embryos have been much less studied. Byrne et al. (2002) found that supplementing media at either 1 or 100 ng/mL IGF2 increased day 7 blastocyst development and cell number, but strangely the 10 ng/mL treatment did not affect blastocyst development. Two other groups could not detect positive effects of IGF2 supplementation on bovine blastocyst development (Flood et al., 1993; Neira et al., 2010).

WNT Family and Inhibitors

The Wingless-related integration site (**WNT**) family is an evolutionary conserved group of glycolipoproteins involved in many crucial and fundamental developmental processes, including stem cell proliferation and differentiation and body axis determination (Steinhart and Angers, 2018). Signaling via WNT involves several receptors and coreceptors containing canonical (ß-catenin dependent) and/or non-canonical (ß-catenin independent) signaling systems (Niehrs, 2012). These pathways are controlled intracellularly by protein phosphorylation and extracellularly by antagonists, including Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 (**DKK1**).

Table 1. Embryokines with recognized influences on bovine blastocyst cell numbers and post-transfer pregnancy outcomes.

Embryokine	Cell number	Pregnancy outcomes	References
DKK1	↑ ICM:TE ratio	↑ Pregnancy rate ↓ Calf birth weight	Denicol et al. (2014), Tribulo et al. (2017a)
FST	↑ Total	ND	Lee et al. (2009), Zhenhua et al. (2017), Rajput et al. (2020)
IL6	↑ ICM ↑ ICM:TE ratio	↑ Embryo-proper and fetal development	Wooldridge and Ealy (2019), Wooldridge et al. (2019), Seekford et al. (2021)
CSF2	↑ ICM ↑ ICM:TE ratio	↓ Pregnancy loss ↑ Pregnancy rate	Loureiro et al. (2009). Denicol et al. (2014)
LIF	↑ or ↓ Total	ND	Fukui and Matsuyama (1994), Vejlsted et al. (2005), Kocyigit and Cevik (2015)
IGF1	↑ Total	↑ Pregnancy rate and calving rate during summer months	Matsui et al. (1995), Byrne et al. (2002), Moreira et al. (2002), Block et al. (2003), Sirisathien and Brackett (2003), Sirisathien et al. (2003a), Jousan and Hansen (2007), Sakagami et al. (2012); Xie et al. (2017)
HDGF	↑ Total	No effects	Gomez et al. (2014, 2017)
TDGF	↑ Total	ND	Kannampuzha-Francis et al. (2017)
GH	↑ Total	No effects	Kolle et al. (2002). Moreira et al. (2002), Iwata et al. (2003)
MT	↑ Total	ND	Wang et al. (2014a,b), Pang et al. (2016)
Retinoids	↑or no effect on ICM ↑ or ↓ TE	ND	Rodriguez et al. (2007b), Gomez et al. (2008)

ND, not determined.

WNT Family Member 7A and 11

Global expression profiling work has identified the expression of several WNTs and various receptors, coreceptors, and inhibitors in bovine embryos (Denicol et al., 2013; Tribulo et al., 2017c). Additionally, WNT7A is produced by the bovine endometrium, but not the preimplantation embryo (Denicol et al., 2013; Tribulo et al., 2017c, 2018b). To date, only WNT7A and WNT11 have been supplemented to IVP bovine embryos, with each ligand improving blastocyst formation on day 7 postfertilization. However, neither influenced blastocyst cell number (Tribulo et al., 2017c, 2018a). Future studies are needed to determine whether WNT7A and/or WNT11 supplementation will improve pregnancy retention and calving rates after ET.

DKK1

The canonical WNT pathway is not required for embryo development to the blastocyst stage in mouse, porcine, and bovine embryos (Huelsken et al., 2000; Xie et al., 2008; Biechele et al., 2013; Denicol et al., 2013; Lim et al., 2013), but there is an interesting involvement of DKK1, a canonical WNT signaling inhibitor, in IVP embryo development. Supplementation with DKK1 does not influence blastocyst development (Denicol et al., 2013, 2014; Tribulo et al., 2017a, 2017b, 2019). However, DKK supplementation alters the composition of embryo cell lineages in blastocysts (Table 1; Denicol et al., 2014). Specifically, DKK1 supports the emergence of primitive endoderm (**PrE**) cells, the subpopulation of ICM cells that will form the hypoblast and eventually the yolk sac (Denicol et al., 2014). Also, DKK1 supplementation from days 5 to 7.5 produced longer day 15 conceptuses (Tribulo et al., 2019) and increased pregnancy retention rates on day 32 but not on days 64 to 76 (Table 1; Denicol et al., 2014; Tribulo et al., 2017a). Calving rates were unaffected by DKK1 treatment before ET, but a decrease in calf birth weights was detected from calves produced from DKK1-supplemented IVP embryos (Tribulo et al., 2017a). This latter finding may have a practical implication as a subset of transferred IVP produce heavier calves than are normally observed after breeding by artificial insemination (**AI**; Farin and Farin, 1995; Farin et al., 2006; Bonilla et al., 2014).

Transforming Growth Factor-β Superfamily

This section describes the activities for several members of the transforming growth factor β (**TGFB**) superfamily. Over 30 members exist in this superfamily (Lorda-Diez et al., 2022). Subfamilies of interest to this discussion include TGFB1, activins, growth and differentiation factors, and bone morphogenic proteins (**BMP**). These factors are homo- and hetero-dimeric glycoproteins that act locally or systemically depending on the specific factor (Massague, 2012; Wang et al., 2014c). The downstream signaling molecules regulated by TGFB family members varies; however, they are best-known for activating the small mothers against decapentaplegic (**SMAD**) family of signal transducers (Massague, 2012; Wang et al., 2014c; Zhang et al., 2015; Rajput et al., 2020).

There is evidence that embryo-derived TGFB molecules can influence embryogenesis during culture. Inhibiting SMAD activity either pharmacologically or by overexpression of an inhibitory SMAD molecule will decrease in vitro blastocyst development (Rajput et al., 2020). Likewise, supplementing embryo cultures with Noggin, which sequesters various TGFB molecules, decreases blastocyst formation (Supplementary Table S1; La Rosa et al., 2011; Rajput et al., 2020). These various inhibitors also reduced TE cell numbers in blastocysts in some but not all studies (La Rosa et al., 2011; Rajput et al., 2020). The identity of the specific embryo-produced TGFB molecules that positively influence IVP embryo development remains unclear, but several candidate molecules have been studied that will be discussed in further depth.

Transforming Growth Factor-β

There are 3 *TGFB* genes in cattle (*TGFB1*, *TGFB2*, and *TGFB3*) but only TGFB1 has been tested thus far as an embryokine. Transcripts for *TGFB1* exist in the bovine endometrium (Tribulo et al., 2018b; Ibrahim et al., 2019) and both TGFB1 receptor subunits are expressed by bovine preimplantation embryos (Roelen et al., 1998; Barrera et al., 2018). Only 2 of the 6 studies observed a benefit for TGFB1 supplementation on blastocyst formation, and none of the studies detected a positive effect of TGFB1 on blastocyst cell numbers (Flood et al., 1993; Yang et al., 1993; Keefer et al., 1994; Lee and Fukui, 1995; Neira et al., 2010; Barrera et al., 2018). No studies have examined whether TGFB1 supplementation influences pregnancy outcomes.

Activins

Activins are best known for their involvement in regulating the hypothalamic–pituitary–gonadal axis, but they also have noted effects on other cells and tissues including the bovine embryo (Namwanje and Brown, 2016). Transcripts for the alpha activin subunit, which generate the activin A complex, are present in the oviduct and in the bovine embryo from the oocyte to morula stage (Gandolfi et al., 1995; Yoshioka et al., 1998). Activin receptor subunits are also expressed in bovine embryos (Yoshioka et al., 1998).

A consistent improvement in blastocyst development has been noted following activin A (**ACTA**) supplementation (Supplementary Table S1; Yoshioka and Kamomae, 1996; Lee et al., 2009; Park et al., 2010; Trigal et al., 2011; Kannampuzha-Francis et al., 2017; Tribulo et al., 2018a), but the effects of ACTA on blastocyst cell numbers is less certain. Several groups failed to detect a beneficial effect of ACTA on cell numbers (Yoshioka and Kamomae, 1996; Park et al., 2010; Kannampuzha-Francis et al., 2017), but one report identified increases in TE cell numbers after ACTA treatment (Trigal et al., 2011). No work has been completed to explore whether ACTA supplementation influences post-transfer pregnancy outcomes, but all indications are that ACTA may be used as a medium supplement to improve blastocyst formation rates in IVF systems.

Bone Morphogenetic Proteins

These TGFB family members are best known for their involvement in bone formation and the development of many other organs and tissues (Wang et al., 2014c). Transcripts for BMP2, 3, 7, and 10 and several of their receptor subunits have been detected in bovine embryos (Jiang et al., 2014; Lee et al., 2014). These and other BMPs are also expressed in the oviduct and uterus during early pregnancy in cattle (Garcia et al., 2014; Jiang et al., 2014; Lee et al., 2014; Tribulo et al., 2018b).

Limited BMP superfamily supplementation studies have been completed, so it is difficult to conclude whether certain

BMPs hold promise as embryokines. There is one report describing increases in blastocyst formation following BMP5 supplementation from days 1 to 2 post-fertilization (Supplementary Table S1; Garcia et al., 2015). Other work found that BMP2 supplementation was ineffective at influencing blastocyst formation in bovine embryos (Lee et al., 2014). BMP4 supplementation decreased blastocyst formation but did not impact blastocyst cell number (Supplementary Table S1; La Rosa et al., 2011). Also, there is evidence that BMP4 reduces TE proliferation and BMP2 and BMP4 reduce interferon-tau expression (Pennington and Ealy, 2012). Thus, there is no strong evidence to list BMPs as embryokines in cattle.

Follistatin

Follistatin (**FST**) is a TGFB1 superfamily antagonist that contains numerous activities throughout the body (Phillips and de Kretser, 1998). It earned its name because it was initially isolated from follicular fluid and was found to inhibit anterior pituitary secretion of follicle stimulating hormone (Phillips and de Kretser, 1998; Rajput et al., 2020). FST transcripts have been detected in the bovine endometrium, but not the bovine embryo (Killeen et al., 2014). Supplementation of 1-10 ng/mL FST to bovine embryos improves blastocyst formation and increases TE cell numbers (Lee et al., 2009; Zhang et al., 2015; Zhenhua et al., 2017; Ashry et al., 2018a; Rajput et al., 2020). The mechanism of FST action remains unclear, but FST does not interfere with activin activity within the embryo (Lee et al., 2009). Instead, it appears to sensitize the SMAD and Ak strain transforming (**AKT**) signaling systems so they are more responsive to activin and potentially other TGFB superfamily members (Ashry et al., 2018b; Rajput et al., 2020). No studies exist that explore whether FST treatment before ET will improve pregnancy retention rates and neonatal calf health.

Cytokines

Cytokines are hormones that were initially identified as regulators of the immune system, but some cytokines also act on other cells throughout the body, including the embryo. Several families of cytokines exist, and these families include various interleukins (**IL**), interferons (**IFN**), colony-stimulating factors (**CSF**), transforming growth factors (**TGF**), and tumor necrosis factors (**TNF**). Multiple members in several of these families have been examined for their embryotrophic abilities.

Colony-Stimulating Factor 2

Colony-stimulating factor 2 (**CSF2**), which has also been referred to as granulocyte-macrophage CSF, belongs to β-common cytokine family (Dougan et al., 2019). This cytokine family also contains **IL** 3 and 5. These 3 cytokines are classified together because they utilize a common β-subunit receptor. The CSF2 receptor is a heterodimeric structure comprised of 2 β-common chains (termed **CSF2RB**) and 2 CSF2-specific α-subunits (termed **CSF2RA**; Dougan et al., 2019). Binding and receptor activation stimulates various intracellular signaling molecules including SRC family kinases, janus-activated kinase (**JAK**) 2, signal transducer and activator of transcription (**STAT**) 5, phosphoinositide 3-kinase (**PI3K**), and MAPK (Becher et al., 2016). CSF2 is produced by the oviduct and uterus during early pregnancy (de Moraes et al., 1997; Becher et al., 2016; Tribulo et al., 2018b). CSF2 influences bovine embryo development, but curiously, expression of CSFRA cannot be detected in bovine pre-implantation embryos (Jiang et al., 2014). This is interesting because bovine embryos are responsive to CSF2 supplementation (see below).

Initial embryo culture studies with recombinant bovine CSF2 (1997–2010) showed that CSF2 increased blastocyst development (de Moraes et al., 1997; Loureiro et al., 2009; Neira et al., 2010), but more recent studies have found no consistent effects of CSF2 on blastocyst development (Hickman et al., 2011; Dobbs et al., 2013a; Tribulo et al., 2017a; Zolini et al., 2020). This probably reflects differences attributed to recombinant protein preparation. The initial CSF2 work utilized a CSF2 preparation from Ciba-Geigy (Basal, Switzerland). whereas later work utilized recombinant protein preparations from other companies.

There may be a sex dependency associated with CSF2 activity. One report observed CSF2 increased blastocyst formation in female embryos but not male embryos (Siqueira and Hansen, 2016). However, another report found no effect of CSF2 and sex in blastocyst formation after blastocysts underwent vitrification (Sosa et al., 2020). Most CSF2 studies failed to detect changes in cell number, but there is some indication that CSF2 may increase ICM cell number (Table 1; Loureiro et al., 2009; Hickman et al., 2011). There is no apparent sex dependency to this effect (Siqueira and Hansen, 2016). There also is some evidence, suggesting that CSF2 functions as a pro-survival agent with the ICM (Dobbs et al., 2013a) and promotes peri-implantation conceptus elongation (Loureiro et al., 2011), but it does not seem to have any noted effects on overall blastocyst quality when assessing apoptosis, interferon-tau (**IFNT**) secretion, DNA methylation status, and TE outgrowth formation rate (Loureiro et al., 2009; Hickman et al., 2011; Dobbs et al., 2013a, 2013b).

Arguably, the most exciting outcome of CSF2 supplementation to IVP embryos is observing benefits in post-transfer pregnancy rates (Table 1). In one report, ET of CSF-treated embryos during summer months in lactating dairy cows did not influence pregnancy rates at first diagnosis (days 30–35), but fewer pregnancies were lost in the recipients that received embryos treated with CSF2 (Loureiro et al., 2009). A follow-up study completed in the winter months detected improvements in pregnancy rates at days 30 to 35 and at calving (Loureiro et al., 2009). A second report detected an improvement in pregnancy rate at day 32, but pregnancy losses after the initial diagnosis prevented detection of CSF2 effects on calving rates (Denicol et al., 2014). Two other reports failed to detect benefits for CSF2 supplementation on post-transfer pregnancy rates (Tribulo et al., 2017a; Zolini et al., 2020); although one of these studies contained too few transfers to adequately assess pregnancy outcomes (Zolini et al., 2020). Rather, that study was designed to explore how transcript profiles may influence pregnancy maintenance. Finally, there is one report suggesting that CSF2 treatment to embryos before ET may improve neonatal and postnatal health of calves (Kannampuzha-Francis et al., 2015). A slight reduction in stillbirths and increases in postnatal growth rates were seen in pregnancies generated from CSF2-treated embryos. Collectively, these observations provide convincing evidence that CSF2 can improve pregnancy retention and postnatal calf health in certain circumstances. It will be exciting to explore the underlying mechanisms used by CSF2 to cause these beneficial outcomes so that the mechanisms may be targeted in bovine embryos before ET.

Interleukins 3 and 5

Exploration of other members of the β-common cytokine family (IL3, IL5) as embryokines remains incomplete. One study failed to detect a positive effect of IL3 on cleavage or blastocyst rates in bovine IVP embryos (Al Naib et al., 2011). No studies have explored whether IL5 acts on bovine embryos.

Leukemia Inhibitory Factor

Leukemia inhibitory factor (**LIF**) is a member of the IL6 family of cytokines. This family also includes IL6, IL11, IL27, IL31, LIF, oncostatin-M (**OSM**), and ciliary neurotropic factor (**CNTF**) (Eulenfeld et al., 2012; Rose-John, 2018). Each IL6 family member binds to a receptor complex comprised of a ligand-specific, α-subunit receptor (e.g., LIF receptor [**LIFR**] and IL6 receptor [**IL6R**]) and a common β-subunit, termed IL6 signal transducer (**IL6ST**, also known as gp130). Family members utilize the IL6ST subunit to control several signal transduction pathways, most notably JAK1/2, STAT3, MAPK, PI3K, and nuclear factor-kappa B (**NFkB**; Rose-John, 2018; Nicola and Babon, 2015). Transcripts for *IL6ST* are detectable from the one cell to blastocyst stage in bovine embryos, but it is unclear whether *LIFR* is expressed in bovine embryos (Wooldridge and Ealy, 2019; Wooldridge et al., 2019). Eckert and Niemann (1998) reported that *LIFR* transcripts could only be detected in IVP bovine embryos and were absent in in vivo produced embryos. Our laboratory found that the relative abundance of *LIFR* mRNA is very low in IVP bovine blastocysts (Wooldridge et al., 2019).

It is unclear if LIF supplementation influences bovine IVP embryo development. Several groups have reported benefits of human or mouse recombinant LIF supplementation on blastocyst formation rates (Neira et al., 2010; Kocyigit and Cevik, 2015, 2017), whereas other groups either did not detect any benefits or observed reductions in blastocyst development after supplementing human recombinant LIF (Fukui and Matsuyama, 1994; Sirisathien et al., 2003a; Vejlsted et al., 2005; Rodriguez et al., 2007a). A similar disparity has been described in the effectiveness of LIF to influence embryo cell numbers and to serve as a cryo-survival agent (Fukui and Matsuyama, 1994; Sirisathien et al., 2003a; Vejlsted et al., 2005; Rodriguez et al., 2007a; Kocyigit and Cevik, 2015, 2017). Some and perhaps a substantial portion of this variation in response may have occurred because of the wide range of LIF concentrations used in these studies (500–6,000 IU [2–100 ng/mL]) or because of the use of different media formulations and various other protocol disparities. However, given the low abundance of *LIFR* in IVP embryos and the potential absence of *LIFR* within in vivo-generated embryos, it appears that LIF does not function as an embryokine up to the blastocyst stage of development in cattle. That being said, LIF supplementation will improve the population of ICM cells that represent **PrE** at days 9 to 10 post-fertilization (Wooldridge and Ealy, 2021b). These cells participate in yolk sac development, suggesting that LIF could influence the development of this structure. However, more work is needed to explore whether LIF could function in this or other ways as the blastocyst is transitioning into a structure that contains multiple germ layers and multiple extraembryonic membranes.

Interleukin-6

Interleukin-6 (**IL6**) is most commonly known for its role in stimulating the acute-phase response in the innate immune response (Eulenfeld et al., 2012); however, it is involved in many biological processes. Bovine embryos produce transcripts for *IL6* and the IL6-specific α-subunit receptor *IL6R* (Wooldridge and Ealy, 2019; Wooldridge et al., 2019). In fact, *IL6* and *IL6R* are the most abundant IL6 family member ligand and α-subunit receptor, respectively, found in bovine blastocysts (Wooldridge et al., 2019). Transcripts for *IL6* are present within the bovine endometrium (Tribulo et al., 2018b). Various intracellular signaling molecules are controlled by IL6 and recent work identified that IL6 can activate STAT3 in bovine embryos between the 8- and 16-cell and blastocyst stages (Wooldridge et al., 2019; Wooldridge and Ealy, 2021a).

Supplementation of recombinant bovine IL6 (1–200 ng/mL) did not affect IVP embryo development when embryos were cultured in groups (Wooldridge and Ealy, 2019; Wooldridge et al., 2019; Sang et al., 2020). However, IL6 supplementation (100 ng/mL) did improve bovine embryo development when zygotes were cultured individually (Wooldridge and Ealy, 2019). This laboratory found that ICM cell numbers were increased after IL6 treatment in group-cultured embryos (Wooldridge and Ealy, 2019, 2021a; Wooldridge et al., 2019). Numerical improvements in ICM cell number could be detected at 1 and 10 ng/mL IL6 but 100 ng/mL provided the most consistent increase in ICM cell numbers (Wooldridge and Ealy, 2019; Table 1; Figure 1). Recent work also found that IL6 supplementation increases PrE cell numbers within day 9/10 bovine blastocysts (Wooldridge and Ealy, 2021a), but more work is needed to explore the significance of this finding. Another group failed to detect improvements in ICM cell numbers after IL6 treatment (Sang et al., 2020). It is unclear why different results have been noted by different laboratories, but that laboratory used an IL6 concentration of 50 ng/mL, which may have not been ideal for detecting changes in ICM cell numbers.

The mechanism of IL6 action on the ICM is still being explored. STAT3 signaling is required for IL6 activity on ICM cells, but it remains unclear if this is the specific signaling molecule used by IL6 to exert its actions (Wooldridge et al., 2019; Wooldridge and Ealy, 2021a). Also, IL6 does not influence cell numbers at the morula stage, and the positive effects of IL6 does not present themselves until a definitive ICM is formed (Wooldridge et al., 2019). Thus, IL6 likely either stimulates ICM cell proliferation or inhibits ICM cell apoptosis.

One recent study explored whether IL6 treatment will improve post-transfer pregnancy outcomes in cattle (Table 1; Seekford et al., 2021). This work found that the embryo proper and fetal development between days 28 and 70 of gestation was altered in pregnancies from IL6-treated blastocysts. Intriguingly, they more closely resemble the developmental trajectory of pregnancies generated by AI than pregnancies generated from non-treated IVP embryos. Pregnancies were not followed to term, and recipient numbers were too low to accurately test whether IL6 affected pregnancy retention rates, but there was a numerical improvement in pregnancy retention in IL6-treated embryos (42% versus 26% for IVP control embryos).

Other Cytokines

Interleukin-1ß (**IL1B**), tumor necrosis factor-α (**TNFA**), and stem cell factor (**SCF**, a.k.a. Kit ligand) also have been examined as potential embryokines in IVP bovine embryos.

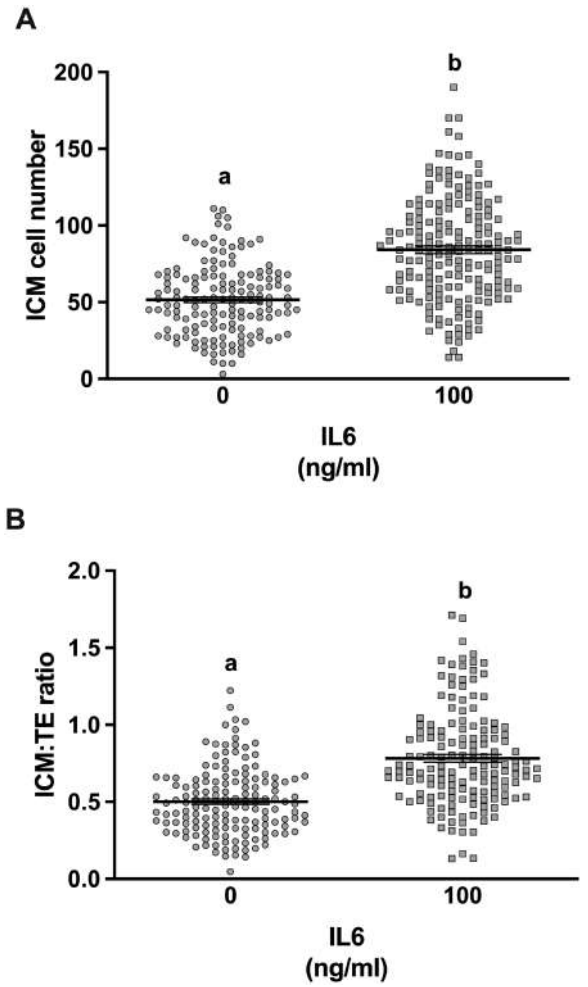


Figure 1. An example of how IL6 supplementation increases ICM cell number and the ICM:TE cell ratio in IVP bovine blastocysts. These data points represent blastocyst cell counts after differential cell staining for CDX2 (TE marker) and DAPI (DNA marker). Panel A shows ICM cell numbers and Panel B shows the ICM-TE ratio from a set of 5 independent studies. Each data point in both figures represents an individual blastocyst (n = 151 for control group and 156 for IL6-treated group). Overall means and SEMs are indicated by the bars. The different superscripts indicate differences ($P < 0.05$). This graph is taken with permission from Wooldridge and Ealy (2019).

Receptors for each of these cytokines have been detected in bovine embryos (Jiang et al., 2014; Dinarello, 2018). Transcripts for *IL1B* and *SCF* have been detected in the bovine endometrium and *IL1B* transcripts have been detected in the bovine embryo (Correia-Alvarez et al., 2015; Lupicka et al., 2015).

Positive effects of IL1B supplementation on bovine IVP development have been noted, but only when embryos were cultured in large groups (25–30 zygotes/50 µL drop; Paula-Lopes et al., 1998). One speculation for this peculiar activity is that IL1B is functioning indirectly, where it is stimulating an embryo-derived embryokine that must be produced from a large number of embryos to reach an effective concentration.

Only a single study could be found that investigated the role of SCF during bovine IVP embryo culture, and that study failed to detect any improvement in blastocyst development after supplementation with 50 ng/mL SCF (Dhali et al., 2009). However, further investigation into SCF as an embryokine seems warranted given that c-Kit is present in bovine embryos and SCF preferentially acts on stem cells in other parts of the body.

Finally, there is no indication that TNF is produced by the bovine endometrium or embryo under normal conditions. Also, TNF supplementation reduced IVP embryo development (Jackson et al., 2012). This suggests that TNF may be serving as a sentinel for conditions when embryo development could produce harmful outcomes, including conditions where pregnancy losses may be great and times when pregnancy may contribute to increasing the severity of a disease.

Growth Factors

Fibroblast Growth Factors

The fibroblast growth factor (**FGF**) superfamily is comprised of at least 18 ligands and 4 primary receptor subtypes (**FGFR**) in mammals (Ornitz and Itoh, 2015). These FGFs are involved in several developmental processes, most notably for this review is FGF control of hypoblast development in mice and cattle (Cockburn and Rossant, 2010; Yamanaka et al., 2010). Binding specificity of FGFs to FGFRs is governed by several factors, including the generation of spliced variation in ligand-binding regions and the association with FGFR co-factors, most notably heparin and Klotho (Ornitz and Itoh, 2015). Several FGFs and all 4 FGFRs are expressed by bovine embryos (Cooke et al., 2009; Ozawa et al., 2013). Intriguingly, FGFR2 and 4 are localized exclusively to the TE, whereas FGFR1 and 3 are located within both the ICM and TE in bovine blastocysts (Ozawa et al., 2013).

Fibroblast growth factor 2 has been the best studied FGF in bovine embryos. Most studies found that supplementing FGF2 (0.05–50 ng/mL) has no effect on blastocyst development (Larson et al., 1992b; Flood et al., 1993; Lee and Fukui, 1995; Neira et al., 2010; Xie et al., 2017), but supplementing 500 ng/mL immediately after fertilization and again on day 4 post-fertilization increased day 7 blastocyst formation (Fields et al., 2011). Supplemental FGF2 does not protect day 5 embryos from the negative effects of heat shock (Fields et al., 2011). Most studies failed to detect any changes in blastocyst cell numbers following FGF2 supplementation (Cooke et al., 2009; Fields et al., 2011; Xie et al., 2017). Additionally, FGF1 and 10 supplementation had no effect on blastocyst cell number (Cooke et al., 2009).

Although FGFs do not appear to benefit IVP embryo development when examining blastocyst formation rates, there is ample evidence implicating FGFs as mediators of early embryogenesis in cattle. Several FGFs (e.g., FGF1, FGF2, and FGF10) stimulate TE cell proliferation, cell migration, and interferon-tau production (Michael et al., 2006; Cooke et al., 2009; Yang et al., 2011b, 2011c; Xie et al., 2017). In the ICM, both FGF2 and FGF4 will stimulate primitive endoderm development within the ICM (Yang et al., 2011a; Kuijk et al., 2012). No studies have been conducted to examine if FGF supplementation before ET will influence pregnancy retention, placental function, or calving rate.

Epidermal Growth Factor

Epidermal growth factor (**EGF**) belongs to the family of ligands that function by interacting with the EGF receptor (**EGFR**; Dreux et al., 2006). Transcripts for EGF have been detected in the oviduct and uterus in cattle (Tribulo et al.,

2018b) and in bovine oocytes and early-stage embryos (Jiang et al., 2014). EGFR is expressed by bovine oocytes and embryos between the 1 cell and blastocyst stages (Jiang et al., 2014).

Several groups have examined the effects of EGF on IVP bovine blastocyst formation (Flood et al., 1993; Yang et al., 1993; Keefer et al., 1994; Lee and Fukui, 1995; Sirisathien and Brackett, 2003; Sirisathien et al., 2003b; Lim et al., 2007; Lott et al., 2011; Sakagami et al., 2012; Ahumada et al., 2013; Xie et al., 2017; Mesalam et al., 2019; Saeed-Zidane et al., 2019). Approximately one-half of the reports showed that EGF increases blastocyst formation while others found no effect of EGF on blastocyst development. Most studies failed to detect changes in blastocyst cell number following EGF supplementation. No studies looking at the effect of EGF individually on pregnancy retention of IVP embryos have been conducted thus far.

Growth Hormone

Growth hormone (**GH**), also referred to as somatotropin, is involved with various actions related to metabolism, reproduction, bone growth, and other physiological functions (Bergan-Roller and Sheridan, 2018). Growth hormone utilizes one receptor, known as growth hormone receptor (**GHR**; Bergan-Roller and Sheridan, 2018). GHR is highly expressed in the liver but is expressed by other cells including the bovine preimplantation embryo (Kolle et al., 1998; Izadyar et al., 2000).

Several groups have tested the effects of GH supplementation on IVP bovine blastocyst production and cell number (Izadyar et al., 2000; Kolle et al., 2002; Moreira et al., 2002; Iwata et al., 2003). Each report found that GH supplementation increased blastocyst formation and cell number (Table 1). Only one report examined the post-transfer consequences of GH supplementation (Iwata et al., 2003), and no improvements in pregnancy rate at day 60 of gestation were observed in pregnancies from GH-treated IVP embryos.

Hepatoma-Derived Growth Factor

Hepatoma-derived growth factor (**HDGF**) is a well-recognized mediator of ribosome biogenesis, RNA processing, DNA damage repair, transcriptional regulation, cell proliferation and migration, and organ development (Bao et al., 2014). The signaling mechanisms of HDGF are largely unknown, but nucleolin (**NCL**) was recently identified as the HDGF receptor (Chen et al., 2015). Transcripts for HDGF have been detected within the bovine endometrium (Munoz et al., 2012; Gomez et al., 2014), and transcripts for *HDGF* and *NCL* have been detected in bovine embryos (Khan et al., 2016).

Two manuscripts were found that studied the effects of HDGF on IVP bovine embryo development. Gomez et al. (2014, 2017) reported that 100 ng/mL HDGF increased day 7 blastocyst formation but only if BSA was present in the culture medium (Supplementary Table S1). However, the beneficial effect on blastocyst development was not observed at day 8. This illustrates that HDGF improved the speed of blastocyst development but did not influence overall blastocyst formation rate. Additionally, increases in TE cell numbers were detected in HDGF-treated embryos in group-cultured blastocysts, but increases in both ICM and TE numbers were observed only when HDGF was supplemented to individually cultured embryos (Table 1; Gomez et al., 2014). HDGF supplementation did not affect pregnancy rate, calving rate, or birth weight of calves after transfer (Gomez et al., 2017). Therefore, HDGF appears to have beneficial effects on IVP bovine embryo development. However, there is currently no evidence of how this translates into producing embryos that are more competent after transfer. Regardless, observed improvements in the speed of IVP blastocyst development could have positive implications when selecting early developing blastocysts for transfer.

Other Growth Factors

Several other growth factors have been explored as potential embryokines in IVP bovine embryos. These include connective tissue growth factor (**CTGF**), hepatocyte growth factor (**HGF**), teratocarcinoma-derived growth factor 1 (**TDGF1**), transforming growth factor-α (**TGFA**), platelet-derived growth factors (**PDGF**), nerve growth factor (**NGF**), and vascular endothelial growth factor A (**VEGFA**). Each of these hormones is expressed in the bovine uterus and/or embryo and transcripts for their receptors have been detected in bovine embryos (Viuff et al., 1995; Jiang et al., 2014; Li et al., 2014; Khan et al., 2016; Tribulo et al., 2018b).

Supplementation with either CTCF, HGF, TDGF1, PDGF, NGF, TGFA, or VEGFA did not have a positive influence on blastocyst formation (Larson et al., 1992b; Flood et al., 1993; Luo et al., 2002; Ahumada et al., 2013; Kannampuzha-Francis et al., 2017); although there was one report demonstrating a beneficial effect of TGFA on blastocyst formation (Larson et al., 1992b). One study found that TDGF1 supplementation increased ICM cell numbers (Table 1; Kannampuzha-Francis et al., 2017).

Steroids

Unlike proteins, relatively little research has been performed on the effects of steroid hormones added to post-fertilization bovine embryo culture media. We found few manuscripts that examined the effects of cortisol, 17β-estradiol (**E2**), and progesterone (**P4**) on bovine IVP embryo production. Receptors for each of these steroids have been detected in bovine embryos (Clemente et al., 2009; Siemieniuch et al., 2010; Jiang et al., 2014), and each steroid has been detected in oviductal fluid during early pregnancy (Lamy et al., 2016). None of these steroids affected IVP embryo development (Larson et al., 2011; Banliat et al., 2019). In fact, P4 supplementation decreased blastocyst cell numbers (Larson et al., 2011). This adverse effect may reflect the excessive amounts of P4 that were tested when comparing these concentrations with the low amount of circulating P4 that would exist during this early period of embryogenesis. In another study, cortisol treatment decreased blastocyst survival after cryopreservation, whereas P4 treatment improved survival after cryopreservation (Banliat et al., 2019).

Other Molecules

Several additional hormones and secreted factors that do not fit into any of the previously mentioned categories have been examined as potential embryokines. To follow is information about several of these molecules.

Melatonin

Melatonin (**MT**) is best known for regulating circadian rhythms through its secretion from the pineal gland but is

also expressed by various other tissues, including the gastrointestinal tract, where it contains other biological activities (Tordjman et al., 2017). Melatonin may act on the bovine embryo through its cognate MT receptors 1A (**MTNR1A**) and 1B (**MTNR1B**; Tordjman et al., 2017). Both receptors have been detected on bovine preimplantation embryos (Sampaio et al., 2012; Wang et al., 2014a). However, melatonin also may act as a free-radical scavenger that does not require its receptors to exert an effect.

All indications are that melatonin acts as an embryokine in bovine embryos. There are several reports that found melatonin supplementation increases IVP bovine blastocyst production (Papis et al., 2007; Wang et al., 2014a, 2014b, 2016; Marques et al., 2018). One report described that melatonin increased blastocyst formation when embryos were cultured in high oxygen conditions (21%, v/v), but blastocyst development was reduced with melatonin supplementation in low oxygen conditions (5%, v/v; Papis et al., 2007). The benefit at high oxygen tension may reflect a free-radical scavenging activity for melatonin, but its interference with embryo development at 5% oxygen remains unclear. There also are reports describing that melatonin increases blastocyst cell number (Table 1) and hatching after freezing and thawing (Wang et al., 2014a, 2014b; Pang et al., 2016; Marques et al., 2021). Additionally, it improves blastocyst production in the presence of paraquat, a pesticide that adversely affects reproduction (Pang et al., 2016). Future studies are needed to determine whether melatonin supplementation also benefits pregnancy retention of IVP embryos.

Retinoids

Retinoids are analogs of vitamin A that mediates various cellular events by binding with a heterodimer nuclear receptor complex composed of retinoic acid receptor (**RAR**) and retinoic acid receptor X (**RXR**; Das et al., 2014; Ghyselinck and Duester, 2019). Several forms of each receptor type are expressed in bovine preimplantation embryos (Mohan et al., 2001, 2002; Mamo et al., 2005).

Three manuscripts have tested the effects of RA or RAR/RXR agonists on bovine IVP embryos (Rodriguez et al., 2006, 2007b; Gomez et al., 2008). Supplementation with all-trans retinoic acid increased blastocyst formation and blastocyst cell numbers in some studies but not others (Rodriguez et al., 2006, 2007b; Gomez et al., 2008). Likewise, exposure to an RXR agonist (LG100268) increased blastocyst formation in one study but not another (Rodriguez et al., 2007b; Gomez et al., 2008). This agonist also reduced blastocyst cell number and increased the incidence of apoptosis (Rodriguez et al., 2007b; Gomez et al., 2008). Therefore, it is unclear if retinoids and RXR agonists are beneficial or hurtful for bovine embryo development.

Fatty Acids and Phospholipids

Polyunsaturated fatty acids (**PUFA**) serve as signaling agents by binding and activating peroxisome proliferator activated receptors (**PPAR**) that are coupled with RXR (Ahmadian et al., 2013). Transcripts for PPAR gamma (***PPARG***) and delta (***PPARD***) have been detected in bovine preimplantation embryos (Mohan et al., 2002; Jiang et al., 2014) and PUFAs exist in bovine uterine fluid (Giller et al., 2018). Two PUFAs have been tested. The omega-6 PUFA, linoleic acid (**LA**), has been shown to either not affect or reduce blastocyst formation of IVP embryos (Tominaga et al., 2000; Pereira et al., 2007; Al Darwich et al., 2010; Absalon-Medina et al., 2014; Batista et al., 2014; Accorsi et al., 2016). Curiously, studies that failed to detect an adverse effect of LA on blastocyst formation also utilized serum-containing medium, whereas the studies that observed reductions in blastocyst formation utilized serum-free media formulations. However, LA consistently improved IVP bovine embryo freeze-thaw survival rates and/or improved blastocyst cell numbers after thawing regardless of whether media contained or lacked serum (Tominaga et al., 2000; Pereira et al., 2007; Al Darwich et al., 2010; Absalon-Medina et al., 2014; Batista et al., 2014; Accorsi et al., 2016).

There has been one report describing how the omega-3 PUFA, docosahexaenoic acid (**DHA**), affects IVP bovine embryo development (Al Darwich et al., 2010). No beneficial effects of DHA were noted on blastocyst development, but supplementation decreased freeze-thaw survival of early forming blastocysts (day 7 post-IVF). However, DHA had no effect on survivability of late forming blastocysts (day 8 post-IVF; Al Darwich et al., 2010).

Prostaglandin F2α (**$PGF_{2\alpha}$**) and prostaglandin E2 (**PGE2**) have been explored as embryokines, but no benefits have been observed in IVP embryos (Scenna et al., 2004). One report, however, suggests that embryo $PGF_{2\alpha}$ production may serve as a marker for embryo quality, with low-quality embryos producing more $PGF_{2\alpha}$ than healthy embryos (Grycmacher et al., 2019).

Studies also have failed to detect any embryokine-associated activities for lysophosphatidic acid (**LPA**). This phospholipid can influence somatic cell proliferation and other cellular events by utilizing a set of G protein-coupled receptors termed LPA receptors (**LPAR**) (Lin et al., 2010). Transcripts for several LPARs have been detected in bovine preimplantation embryos (Jiang et al., 2014; Torres et al., 2014) and LPA is present in the bovine uterus (Woclawek-Potocka et al., 2009). However, one publication studying the effects of LPA supplementation on IVP bovine embryo development failed to show any benefit of LPA on blastocyst formation (Torres et al., 2014) while another found LPA supplementation accelerated IVP blastocyst formation (Yu et al., 2021).

To summarize, more work is needed to explore the potential benefits of PUFAs, prostaglandin, and LPA on post-transfer embryo survival in cattle. There is currently little evidence to suggest that these fatty acids and fatty acid derivatives may function as embryokines other than observing that LA functions as a cryoprotective agent in IVP bovine embryos.

Thyroid Hormone

The thyroid hormones, triiodothyronine (**T_3**) and thyroxin (**T_4**), have been detected in bovine uterine homogenate and preimplantation embryos express their receptors (Rho et al., 2018). Ashkar et al. (2010) found that a mix of T_3 and T_4 increased blastocyst formation. No studies have examined cell number or pregnancy retention after their supplementation.

Hyaluronic Acid

Hyaluronic acid (**HA**) is glycosaminoglycan that is part of the extracellular matrix and its receptor, *CD44*, is expressed by bovine preimplantation embryos (Furnus et al., 2003). It remains unclear whether HA benefits IVP embryo

development. One report found that supplementing HA increased IVP blastocyst formation (Furnus et al., 1998), but another study failed to detect any benefit when using the same HA concentration (Saeed-Zidane et al., 2019). No effects on blastocyst cell number were detected in either report, but both studies found that HA may improve IVP embryo cryosurvival (Furnus et al., 1998; Saeed-Zidane et al., 2019).

Embryokine Cocktails

There are several reports describing added benefits of supplementing two or more bioactive factors during in vitro bovine embryo culture (Supplementary Table S2). The idea is that bovine embryos are exposed to multiple embryokines and other factors in the oviduct and uterus, so increasing the complexity of the embryo culture media with several embryokines will better mimic the oviduct and uterine environments. This concept is especially interesting when considering the possibility that synergistic actions may exist for some factors. Evidence of such synergy has not been fully described, but there is evidence of additive effects for certain embryokine cocktails. Neira *et al.* were among the first to describe additive effects for embryokines, and they observed that IGF1, IGF2, FGF2, TGFβ1, CSF2, and LIF did not affect bovine blastocyst formation when provided separately but improved blastocyst production when added together (Neira et al., 2010). More recent work by this laboratory found that combining EGF, FGF2, and IGF1 did not produce any additive effects on blastocyst formation but these factors contained differential abilities to influence total and TE cell numbers in embryos (Xie et al., 2017). In that work, IGF1 supplementation increased TE cell numbers, whereas supplementation of either EGF or FGF2 could not; however, EGF and FGF2 combination treatment increased TE cell numbers. Several additional examples of embryokine cocktails are listed in Supplementary Table S2. A follow-up study explored the effects of an EGF, FGF2, and IGF1 cocktail on embryo and fetal development up to day 56 of gestation (Vailes et al., 2019). No improvements in embryo and fetal development and pregnancy rates were observed.

Conclusions and Moving Forward

Numerous factors have been studied for their ability to influence bovine embryo development and/or post-transfer pregnancy outcomes in cattle. Based on the literature that was examined, we propose that at least 8 embryokines will improve IVP bovine blastocyst formation, 9 embryokines influence TE or ICM cell numbers, and 5 embryokines improve embryo survival to stressors, including cryopreservation (Figure 2). Also, 4 embryokines have been identified for improving pregnancy retention of IVP embryos after ET (Table 1). Improvements in IVP blastocyst formation are beneficial from a commercial setting as this will increase the number of transferable IVP embryos. In some cases, it is unclear if these embryokine-treated blastocysts have greater competency to survive after ET. There are currently a subset of embryokines that can influence ICM, TE, and/or total cell numbers in ways that should improve embryo quality and therefore overall competency after ET. A correlation between TE number and pregnancy retention has not been established, but there is some evidence, suggesting that improvements in ICM cell number could improve post-transfer pregnancy

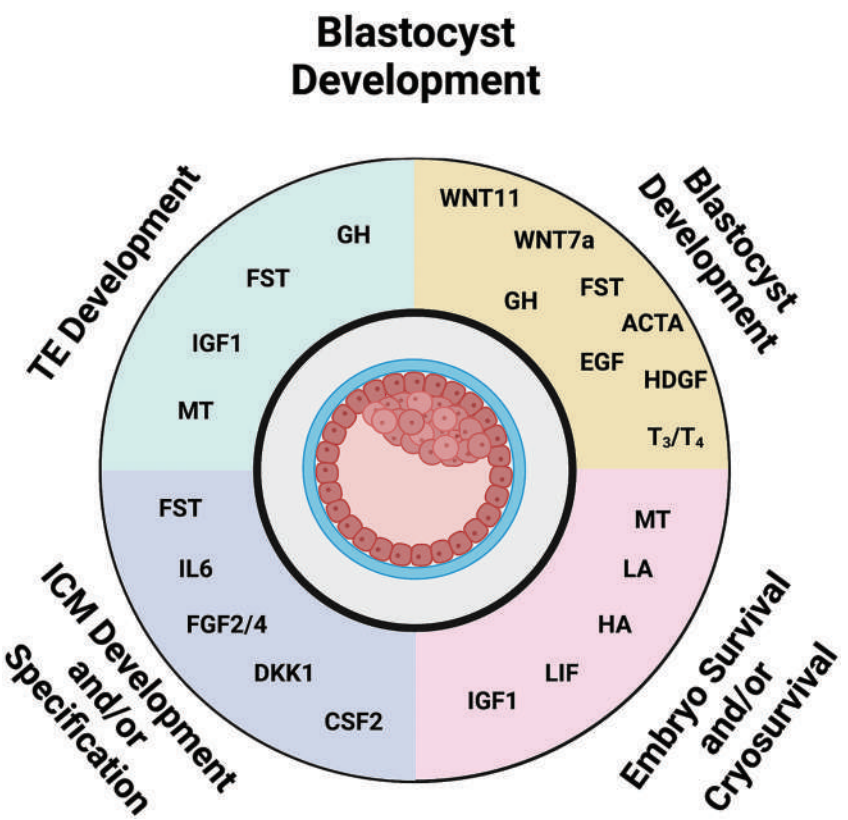


Figure 2. A summary of embryokines with documented positive effects on blastocyst development, embryo survival, including cryosurvival, ICM development and/or specification, and TE development.

retention (Iwasaki et al., 1990; Ushijima et al., 2008; Loureiro et al., 2009; Denicol et al., 2014).

Much less information is available for most embryokines on whether their supplementation will have a positive influence on pregnancy outcomes after ET. While this is unfortunate, it is understandable when considering the effort and expense needed to complete large-scale ET studies in cattle. Thankfully, several supplements appear to benefit pregnancies derived from IVP bovine embryos (Figure 2). Four such embryokines can be mentioned here: CSF2, DKK1, IL6, and IGF1. The benefits of IGF1 only manifest in summer months when recipients are exposed to elevated temperatures. Also, IL6 has only been tested up to day 70 of gestation, where its supplementation produces pregnancies that more closely resemble pregnancies derived in vivo through AI (Seekford et al., 2021). Large-scale ET studies are needed to describe whether this potential benefit on pregnancies will produce healthy calves.

One conclusion that can be drawn from these observations is that it is possible to improve IVP bovine embryo development, quality, and post-transfer survival by supplementing bioactive factors that are found in the oviduct, uterus, or produced by the embryo itself. More work is needed to clarify the post-transfer consequences of adding these putative embryokines and in exploring the specific combination of embryokines that best simulate the oviduct and uterine environments. Ultimately, it is essential that improvements be made in our understanding of the specific signaling networks required for proper embryogenesis and post-blastocyst survival so that we may ensure that a greater percentage of fertilized embryos achieve the development and quality requirements needed to be considered for ET. It also is imperative that we better understand how to program the early developing IVP embryo for optimum pregnancy retention and the production of a healthy calf.

Acknowledgments

Funding for this work was provided by Agriculture and Food Research Initiative Competitive Grant numbers 2017-67015-2646 and 2021-67015-34485 from the USDA National Institute of Food and Agriculture and by the National Institute of Health grant number R21-OD026516-01. Fellowship support for LKW was provided by the Institute for Critical Technology and Applied Science (ICTAS) Doctoral Scholars Program at Virginia Tech and by Agriculture and Food Research Initiative Competitive Grant number 2018-67011-27993 from the USDA National Institute of Food and Agriculture. M.L.R. and A.D.E. are participants on Multistate Project NE1727: *Influence of Ovary, Uterus, and Embryo on Pregnancy Success in Ruminants*.

Conflict of interest

The authors do not have any actual or potential conflicts of interest that may affect their ability to objectively present or review research or data.

Literature Cited

Absalon-Medina, V. A., S. J. Bedford-Guaus, R. O. Gilbert, L. C. Siqueira, G. Esposito, A. Schneider, S. H. Cheong, and W. R. Butler. 2014. The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 on in vitro bovine embryo production and cryopreservation. *J. Dairy Sci.* 97:6164–6176. doi:10.3168/jds.2013-7719.

Accorsi, M. F., B. C. Leao, N. A. Rocha-Frigoni, S. H. Perri, and G. Z. Mingoti. 2016. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured in vitro with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance. *Zygote*. 24:485–494. doi:10.1017/S0967199415000428.

Ahmadian, M., J. M. Suh, N. Hah, C. Liddle, A. R. Atkins, M. Downes, and R. M. Evans. 2013. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med*. 19:557–566. doi:10.1038/nm.3159.

Ahumada, C. J., I. Salvador, A. Cebrian-Serrano, R. Lopera, and M. A. Silvestre. 2013. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality. *Animal*. 7:455–462. doi:10.1017/S1751731112001991.

Al Darwich, A., C. Perreau, M. H. Petit, P. Papillier, J. Dupont, D. Guillaume, P. Mermillod, and F. Guignot. 2010. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKalpha phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 93:30–36. doi:10.1016/j.prostaglandins.2010.06.002.

Al Naib, A., S. Mamo, G. M. O'Gorman, P. Lonergan, A. Swales, and T. Fair. 2011. Regulation of non-classical major histocompatability complex class I mRNA expression in bovine embryos. *J. Reprod. Immunol*. 91:31–40. doi:10.1016/j.jri.2011.05.005.

Ashkar, F. A., E. Semple, C. H. Schmidt, E. St John, P. M. Bartlewski, and W. A. King. 2010. Thyroid hormone supplementation improves bovine embryo development in vitro. *Hum. Reprod*. 25:334–344. doi:10.1093/humrep/dep394.

Ashry, M., K. Lee, J. K. Folger, S. K. Rajput, and G. W. Smith. 2018a. Follistatin supplementation during in vitro embryo culture improves developmental competence of bovine embryos produced using sex-sorted semen. *Reprod. Biol*. 18:267–273. doi:10.1016/j.repbio.2018.06.004.

Ashry, M., S. K. Rajput, J. K. Folger, J. G. Knott, N. A. Hemeida, O. M. Kandil, R. S. Ragab, and G. W. Smith. 2018b. Functional role of AKT signaling in bovine early embryonic development: potential link to embryotrophic actions of follistatin. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 16:1. doi:10.1186/s12958-017-0318-6.

Augustin, R., P. Pocar, C. Wrenzycki, H. Niemann, and B. Fischer. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 126:91–99. doi:10.1530/rep.0.1260091.

Baker, J., M. P. Hardy, J. Zhou, C. Bondy, F. Lupu, A. R. Bellve, and A. Efstratiadis. 1996. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol*. 10:903–918. doi:10.1210/mend.10.7.8813730.

Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 75:73–82. doi:10.1016/S0092-8674(05)80085-6.

Banliat, C., F. Dubuisson, E. Corbin, J. Beurois, D. Tomas, D. Le Bourhis, P. Salvetti, V. Labas, P. Mermillod, and M. Saint-Dizier. 2019. Intraoviductal concentrations of steroid hormones during in vitro culture changed phospholipid profiles and cryotolerance of bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev*. 86:661–672. doi:10.1002/mrd.23144.

Bao, C., J. Wang, W. Ma, X. Wang, and Y. Cheng. 2014. HDGF: a novel jack-of-all-trades in cancer. *Future Oncol*. 10:2675–2685. doi:10.2217/fon.14.194.

Barrera, A. D., E. V. Garcia, and D. C. Miceli. 2018. Effect of exogenous transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on early bovine embryo development. *Zygote*. 26:232–241. doi:10.1017/S096719941800014X.

Batista, R. I., N. R. Raposo, P. H. Campos-Junior, M. M. Pereira, L. S. Camargo, B. C. Carvalho, M. A. Gama, and J. H. Viana. 2014. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of in vitro-produced crossbred

bovine embryos. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5:33. doi:10.1186/2049-1891-5-33.

Becher, B., S. Tugues, and M. Greter. 2016. GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity*. 45:963–973. doi:10.1016/j.immuni.2016.10.026.

Bergan-Roller, H. E., and M. A. Sheridan. 2018. The growth hormone signaling system: insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 258:119–133. doi:10.1016/j.ygcen.2017.07.028.

Biechele, S., K. Cockburn, F. Lanner, B. J. Cox, and J. Rossant. 2013. Porcn-dependent Wnt signaling is not required prior to mouse gastrulation. *Development*. 140:2961–2971. doi:10.1242/dev.094458.

Block, J., M. Drost, R. L. Monson, J. J. Rutledge, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopes, O. M. Ocon, C. E. Krininger, J. Liu, and P. J. Hansen. 2003. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J. Anim. Sci.* 81:1590–1602. doi:10.2527/2003.8161590x

Block, J., A. E. Fischer-Brown, T. M. Rodina, A. D. Ealy, and P. J. Hansen. 2007. The effect of in vitro treatment of bovine embryos with IGF-1 on subsequent development in utero to day 14 of gestation. *Theriogenology*. 68:153–161. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.045.

Block, J., C. Wrenzycki, H. Niemann, D. Herrmann, and P. J. Hansen. 2008. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 75:895–903. doi:10.1002/mrd.20826.

Bonilla, A. Q., L. J. Oliveira, M. Ozawa, E. M. Newsom, M. C. Lucy, and P. J. Hansen. 2011a. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Mol Cell Endocrinol.* 332:170–179. doi:10.1016/j.mce.2010.10.009.

Bonilla, A. Q., M. Ozawa, and P. J. Hansen. 2011b. Timing and dependence upon mitogen-activated protein kinase signaling for pro-developmental actions of insulin-like growth factor 1 on the preimplantation bovine embryo. *Growth Horm IGF Res.* 21:107–111. doi:10.1016/j.ghir.2011.03.003.

Bonilla, L., J. Block, A. C. Denicol, and P. J. Hansen. 2014. Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. *J. Dairy Sci.* 97:229–239. doi:10.3168/jds.2013-6943.

Byrne, A. T., J. Southgate, D. R. Brison, and H. J. Leese. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol. Reprod. Dev.* 62:489–495. doi:10.1002/mrd.10153.

Chen, S. C., T. H. Hu, C. C. Huang, M. L. Kung, T. H. Chu, L. N. Yi, S. T. Huang, H. H. Chan, J. H. Chuang, L. F. Liu, et al. 2015. Hepatoma-derived growth factor/nucleolin axis as a novel oncogenic pathway in liver carcinogenesis. *Oncotarget*. 6:16253–16270. doi:10.18632/oncotarget.3608.

Clemente, M., J. de La Fuente, T. Fair, A. Al Naib, A. Gutierrez-Adan, J. F. Roche, D. Rizos, and P. Lonergan. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium?. *Reproduction*. 138:507–517. doi:10.1530/REP-09-0152.

Cockburn, K., and J. Rossant. 2010. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.* 120:995–1003. doi:10.1172/JCI41229.

Cooke, F. N., K. A. Pennington, Q. Yang, and A. D. Ealy. 2009. Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine conceptus development and regulate interferon-tau expression from trophectoderm. *Reproduction*. 137:259–269. doi:10.1530/REP-08-0396.

Correia-Alvarez, E., E. Gomez, D. Martin, S. Carrocera, S. Perez, J. Otero, N. Peynot, C. Giraud-Delville, J. N. Caamano, O. Sandra, et al. 2015. Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor (type I) in the bovine endometrium and embryo. *J. Reprod. Immunol.* 110:1–13. doi:10.1016/j.jri.2015.03.006.

Das, B. C., P. Thapa, R. Karki, S. Das, S. Mahapatra, T. C. Liu, I. Torregroza, D. P. Wallace, S. Kambhampati, P. Van Veldhuizen, et al. 2014. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg. Med. Chem.* 22:673–683. doi:10.1016/j.bmc.2013.11.025.

de Moraes, A. A., J. A. Davidson, J. G. Fleming, F. W. Bazer, J. L. Edwards, J. G. Betts, and P. J. Hansen. 1997. Lack of effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on secretion of interferon-tau, other proteins, and prostaglandin E2 by the bovine and ovine conceptus. *Domest Anim. Endocrinol.* 14:193–197. doi:10.1016/s0739-7240(97)00002-7.

Denicol, A. C., J. Block, D. E. Kelley, K. G. Pohler, K. B. Dobbs, C. J. Mortensen, M. S. Ortega, and P. J. Hansen. 2014. The WNT signaling antagonist Dickkopf-1 directs lineage commitment and promotes survival of the preimplantation embryo. *FASEB J.* 28:3975–3986. doi:10.1096/fj.14-253112.

Denicol, A. C., K. B. Dobbs, K. M. McLean, S. F. Carambula, B. Loureiro, and P. J. Hansen. 2013. Canonical WNT signaling regulates development of bovine embryos to the blastocyst stage. *Sci. Rep.* 3:1266. doi:10.1038/srep01266.

Dhali, A., V. M. Anchamparuthy, S. P. Butler, R. E. Pearson, and F. C. Gwazdauskas. 2009. In vitro development of bovine embryos cultured with stem cell factor or insulin-like growth factor-I following IVF with semen of two bulls having different field fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 116:188–195. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.02.007.

Dinarello, C. A. 2018. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* 281:8–27. doi:10.1111/imr.12621.

Dobbs, K. B., F. A. Khan, M. Sakatani, J. I. Moss, M. Ozawa, A. D. Ealy, and P. J. Hansen. 2013a. Regulation of pluripotency of inner cell mass and growth and differentiation of trophectoderm of the bovine embryo by colony stimulating factor 2. *Biol. Reprod.* 89:141. doi:10.1095/biolreprod.113.113183.

Dobbs, K. B., M. Rodriguez, M. J. Sudano, M. S. Ortega, and P. J. Hansen. 2013b. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS One* 8:e66230. doi:10.1371/journal.pone.0066230.

Dougan, M., G. Dranoff, and S. K. Dougan. 2019. GM-CSF, IL-3, And IL-5 family of cytokines: regulators of inflammation. *Immunity*. 50:796–811. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.022.

Dreux, A. C., D. J. Lamb, H. Modjtahedi, and G. A. Ferns. 2006. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 186:38–53. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.038.

Ealy, A. D., L. K. Wooldridge, and S. R. McCoski. 2019. Board invited review: post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *J. Anim. Sci.* 97:2555–2568. doi:10.1093/jas/skz116.

Eckert, J., and H. Niemann. 1998. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Mol. Hum. Reprod.* 4:957–965. doi:10.1093/molehr/4.10.957.

Eulenfeld, R., A. Dittrich, C. Khouri, P. J. Muller, B. Mutze, A. Wolf, and F. Schaper. 2012. Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur. J. Cell Biol.* 91:486–495. doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.010.

Farin, P. W., and C. E. Farin. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol. Reprod.* 52:676–682. doi:10.1095/biolreprod52.3.676.

Farin, P. W., J. A. Piedrahita, and C. E. Farin. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 65:178–191. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.022.

Fields, S. D., P. J. Hansen, and A. D. Ealy. 2011. Fibroblast growth factor requirements for in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*. 75:1466–1475. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.12.007

Flood, M. R., T. L. Gage, and T. D. Bunch. 1993. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development in vitro. *Theriogenology*. 39:823–833. doi:10.1016/0093-691X(93)90421-Z

Fukui, Y., and K. Matsuyama. 1994. Development of in vitro matured and fertilized bovine embryos cultured in media containing human leukemia inhibitory factor. *Theriogenology*. 42:663–673. doi:10.1016/0093-691x(94)90383-t.

Furnus, C. C., D. G. de Matos, and A. G. Martinez. 1998. Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. 49:1489–1499. doi:10.1016/s0093-691x(98)00095-8.

Furnus, C. C., A. Valcarcel, F. N. Dulout, and A. L. Errecalde. 2003. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology*. 60:1633–1644. doi:10.1016/s0093-691x(03)00116-x.

Gandolfi, F., S. Modina, T. A. Brevini, L. Passoni, P. Artini, F. Petraglia, and A. Lauria. 1995. Activin beta A subunit is expressed in bovine oviduct. *Mol. Reprod. Dev*. 40:286–291. doi:10.1002/mrd.1080400304.

Garcia, E. V., D. C. Miceli, G. Rizo, P. A. Valdecantos, and A. D. Barrera. 2015. Effect of early addition of bone morphogenetic protein 5 (BMP5) to embryo culture medium on in vitro development and expression of developmentally important genes in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. 84:589–599. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.04.018.

Garcia, E. V., P. A. Valdecantos, D. Barrera, M. Roldan-Olarte, and D. C. Miceli. 2014. Bone morphogenetic proteins in the bovine oviduct: differential expression of BMP-5 in the isthmus during the estrous cycle. *Theriogenology*. 81:1032–1041. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.025.

Geisert, R. D., C. Y. Lee, F. A. Simmen, M. T. Zavy, A. E. Fliss, F. W. Bazer, and R. C. Simmen. 1991. Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod*. 45:975–983. doi:10.1095/biolreprod45.6.975.

Ghyselinck, N. B., and G. Duester. 2019. Retinoic acid signaling pathways. *Development* 146. doi:10.1242/dev.167502.

Giller, K., B. Drews, J. Berard, H. Kienberger, M. Schmicke, J. Frank, B. Spanier, H. Daniel, G. Geisslinger, and S. E. Ulbrich. 2018. Bovine embryo elongation is altered due to maternal fatty acid supplementation. *Biol. Reprod*. 99:600–610. doi:10.1093/biolre/ioy084.

Gomez, E., Carrocera, S., D. Martin, M. J. Sanchez-Calabuig, A. Gutierrez-Adan, A. Murillo, and M. Munoz. 2017. Hepatoma-derived growth factor: protein quantification in uterine fluid, gene expression in endometrial-cell culture and effects on in vitro embryo development, pregnancy and birth. *Theriogenology*. 96:118–125. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.04.008

Gomez, E., E. Correia-Alvarez, J. N. Caamano, C. Diez, S. Carrocera, N. Peynot, D. Martin, C. Giraud-Delville, V. Duranthon, O. Sandra, et al. 2014. Hepatoma-derived growth factor: from the bovine uterus to the in vitro embryo culture. *Reproduction*. 148:353–365. doi:10.1530/REP-14-0304.

Gomez, E., A. Rodriguez, M. Munoz, J. N. Caamano, S. Carrocera, D. Martin, N. Facal, and C. Diez. 2008. Development and quality of bovine morulae cultured in serum-free medium with specific retinoid receptor agonists. *Reprod. Fertil. Dev*. 20:884–891. doi:10.1071/rd08103.

Grycmacher, K., D. Boruszewska, E. Sinderewicz, I. Kowalczyk-Zieba, J. Staszkiewicz-Chodor, and I. Woclawek-Potocka. 2019. Prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) production possibility and its receptors expression in the early- and late-cleaved preimplantation bovine embryos. *BMC Vet. Res*. 15:203. doi:10.1186/s12917-019-1939-0.

Hansen, P. J. 2020. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J. Anim. Sci*. 98. doi:10.1093/jas/skaa288.

Herrler, A., A. Lucas-Hahn, and H. Niemann. 1992. Effects of insulin-like growth factor-I on in-vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 37:1213–1224.

Hickman, C. F., A. Ainslie, A. D. Ealy, C. J. Ashworth, and J. A. Rooke. 2011. Effect of ovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on bovine in vitro embryo development and blastocyst interferon-tau secretion. *Reprod. Domest. Anim*. 46:608–615. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01710.x.

Huelsken, J., R. Vogel, V. Brinkmann, B. Erdmann, C. Birchmeier, and W. Birchmeier. 2000. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J. Cell Biol*. 148:567–578. doi:10.1083/jcb.148.3.567.

Ibrahim, L. A., J. A. Rizo, P. L. P. Fontes, G. C. Lamb, and J. J. Bromfield. 2019. Seminal plasma modulates expression of endometrial inflammatory meditators in the bovinedagger. *Biol. Reprod*. 100:660–671. doi:10.1093/biolre/ioy226.

Iwasaki, S., N. Yoshiba, H. Ushijima, S. Watanabe, and T. Nakahara. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J. Reprod. Fertil*. 90:279–284. doi:10.1530/jrf.0.0900279.

Iwata, H., M. Ohota, S. Hashimoto, K. Kimura, M. Isaji, and M. Miyake. 2003. Stage-specific effect of growth hormone on developmental competence of bovine embryos produced in-vitro. *J. Reprod. Dev*. 49:493–499. doi:10.1262/jrd.49.493.

Izadyar, F., H. T. Van Tol, W. G. Hage, and M. M. Bevers. 2000. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during in vitro development. *Mol. Reprod. Dev*. 57:247–255. doi:10.1002/1098-2795(200011)57:3<247::AID-MRD6>3.0.CO;2-Q.

Jackson, L. R., C. E. Farin, and S. Whisnant. 2012. Tumor necrosis factor alpha inhibits in vitro bovine embryo development through a prostaglandin mediated mechanism. *J. Anim. Sci. Biotechnol*. 3:7. doi:10.1186/2049-1891-3-7.

Jiang, Z., J. Sun, H. Dong, O. Luo, X. Zheng, C. Obergfell, Y. Tang, J. Bi, R. O'Neill, Y. Ruan, et al. 2014. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. *BMC Genomics* 15:756. doi:10.1186/1471-2164-15-756.

Jousan, F. D., and P. J. Hansen. 2004. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol. Reprod*. 71:1665–1670. doi:10.1095/biolreprod.104.032102

Jousan, F. D., and P. J. Hansen. 2007. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol. Reprod. Dev*. 74:189–196. doi:10.1002/mrd.20527.

Jousan, F. D., L. J. Oliveira, and P. J. Hansen. 2008. Short-term culture of in vitro produced bovine preimplantation embryos with insulin-like growth factor-I prevents heat shock-induced apoptosis through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol. Reprod. Dev*. 75:681–688. doi:10.1002/mrd.20830.

Kannampuzha-Francis, J., A. C. Denicol, B. Loureiro, K. Kaniyamattam, M. S. Ortega, and P. J. Hansen. 2015. Exposure to colony stimulating factor 2 during preimplantation development increases postnatal growth in cattle. *Mol. Reprod. Dev*. 82:892–897. doi:10.1002/mrd.22533.

Kannampuzha-Francis, J., P. Tribulo, and P. J. Hansen. 2017. Actions of activin A, connective tissue growth factor, hepatocyte growth factor and teratocarcinoma-derived growth factor 1 on the development of the bovine preimplantation embryo. *Reprod. Fertil. Dev*. 29:1329–1339. doi:10.1071/RD16033.

Keefer, C. L., S. L. Stice, A. M. Paprocki, and P. Golueke. 1994. In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos: cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology*. 41:1323–1331. doi:10.1016/0093-691x(94)90491-z.

Khan, D. R., E. Fournier, I. Dufort, F. J. Richard, J. Singh, and M. A. Sirard. 2016. Meta-analysis of gene expression profiles in granulosa cells during folliculogenesis. *Reproduction*. 151:R103–R110. doi:10.1530/REP-15-0594.

Khurana, N. K., and H. Niemann. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod*. 62:847–856. doi:10.1095/biolreprod62.4.847.

Killeen, A. P., D. G. Morris, D. A. Kenny, M. P. Mullen, M. G. Diskin, and S. M. Waters. 2014. Global gene expression in endometrium

of high and low fertility heifers during the mid-luteal phase of the estrous cycle. *BMC Genomics* 15:234. doi:10.1186/1471-2164-15-234.

Kocyigit, A., and M. Cevik. 2015. Effects of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor-I on the cell allocation and cryotolerance of bovine blastocysts. *Cryobiology*. 71:64–69. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.05.068.

Kocyigit, A., and M. Cevik. 2017. Leucemia inhibitory factor; investigating the time-dependent effect on viability of vitrified bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 52:1113–1119. doi:10.1111/rda.13040.

Kolle, S., F. Sinowatz, G. Boie, D. Lincoln, G. Palma, M. Stojkovic, and E. Wolf. 1998. Topography of growth hormone receptor expression in the bovine embryo. *Histochem. Cell Biol.* 109:417–419. doi:10.1007/s004180050243.

Kolle, S., M. Stojkovic, G. Boie, E. Wolf, and F. Sinowatz. 2002. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 61:180–186. doi:10.1002/mrd.1145.

Kuijk, E. W., L. T. van Tol, H. Van de Velde, R. Wubbolts, M. Welling, N. Geijsen, and B. A. Roelen. 2012. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development*. 139:871–882. doi:10.1242/dev.071688.

La Rosa, I., L. S. Camargo, M. M. Pereira, R. Fernandez-Martin, D. A. Paz, and D. F. Salamone. 2011. Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on in vitro maturation and culture of bovine preimplantation embryos. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9:18. doi:10.1186/1477-7827-9-18

Lamy, J., P. Liere, A. Pianos, F. Aprahamian, P. Mermillod, and M. Saint-Dizier. 2016. Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology*. 86:1409–1420. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.086.

Larson, J. E., R. L. Krisher, and G. C. Lamb. 2011. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 23:311–318. doi:10.1071/RD10106.

Larson, R. C., G. G. Ignotz, and W. B. Currie. 1992a. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle. *Development*. 115:821–826. doi:10.1242/dev.115.3.821.

Larson, R. C., G. G. Ignotz, and W. B. Currie. 1992b. Transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 33:432–435. doi:10.1002/mrd.1080330409.

Lee, E. S., and Y. Fukui. 1995. Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*. 44:71–83. doi:10.1016/0093-691X(95)00149-3.

Lee, K. B., A. Bettegowda, G. Wee, J. J. Ireland, and G. W. Smith. 2009. Molecular determinants of oocyte competence: potential functional role for maternal (oocyte-derived) follistatin in promoting bovine early embryogenesis. *Endocrinology*. 150:2463–2471. doi:10.1210/en.2008-1574.

Lee, K. B., J. K. Folger, S. K. Rajput, and G. W. Smith. 2014. Temporal regulation of mRNAs for select bone morphogenetic proteins (BMP), BMP receptors and their associated SMAD proteins during bovine early embryonic development: effects of exogenous BMP2 on embryo developmental progression. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12:67. doi:10.1186/1477-7827-12-67.

Li, C., Y. Ma, K. Yi, C. Wang, W. Li, Z. Liu, L. Sun, S. Chen, J. Yu, H. Li, et al. 2014. The interactions between nerve growth factor and gonadotrophins in bovine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* 149:117–123. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.06.030.

Lim, K. T., M. K. Gupta, S. H. Lee, Y. H. Jung, D. W. Han, and H. T. Lee. 2013. Possible involvement of wnt/beta-catenin signaling pathway in hatching and trophectoderm differentiation of pig blastocysts. *Theriogenology*. 79:284–290. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.08.018

Lim, K. T., G. Jang, K. H. Ko, W. W. Lee, H. J. Park, J. J. Kim, S. H. Lee, W. S. Hwang, B. C. Lee, and S. K. Kang. 2007. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*. 67:293–302. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.011.

Lin, M. E., D. R. Herr, and J. Chun. 2010. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91:130–138. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.02.002.

Liu, J. P., J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 75:59–72.

Liu, Z., R. H. Foote, and X. Yang. 1995. Development of early bovine embryos in co-culture with KSOM and taurine, superoxide dismutase or insulin. *Theriogenology*. 44:741–750. doi:10.1016/0093-691x(95)00253-5.

Lorda-Diez, C. I., C. Duarte-Olivenza, J. M. Hurle, and J. A. Montero. 2022. Transforming growth factor beta signaling: the master sculptor of fingers. *Dev. Dyn.* 251(1):125–136. doi:10.1002/dvdy.349.

Lott, W. M., V. M. Anchamparuthy, M. L. McGilliard, I. K. Mullarky, and F. C. Gwazdauskas. 2011. Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development of in vitro-produced bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 46:585–594. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01706.x.

Loureiro, B., J. Block, M. G. Favoreto, S. Carambula, K. A. Pennington, A. D. Ealy, and P. J. Hansen. 2011. Consequences of conceptus exposure to colony-stimulating factor 2 on survival, elongation, interferon-{tau} secretion, and gene expression. *Reproduction*. 141:617–624. doi:10.1530/REP-10-0511. REP-10-0511

Loureiro, B., L. Bonilla, J. Block, J. M. Fear, A. Q. Bonilla, and P. J. Hansen. 2009. Colony-stimulating factor 2 (CSF-2) improves development and posttransfer survival of bovine embryos produced in vitro. *Endocrinology*. 150:5046–5054. doi:10.1210/en.2009-0481. en.2009-0481

Luo, H., K. Kimura, M. Aoki, and M. Hirako. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes the early development of bovine embryo in the presence of cumulus cells. *J. Vet. Med. Sci.* 64:967–971. doi:10.1292/jvms.64.967.

Lupicka, M., G. Bodek, N. Shpigel, E. Elnekave, and A. J. Korzekwa. 2015. Identification of pluripotent cells in bovine uterus: in situ and in vitro studies. *Reproduction*. 149:317–327. doi:10.1530/REP-14-0348.

Makarevich, A. V., and M. Markkula. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.* 66:386–392. doi:10.1095/biolreprod66.2.386.

Mamo, S., S. Ponsuksili, K. Wimmers, M. Gilles, and K. Schellander. 2005. Expression of retinoid X receptor transcripts and their significance for developmental competence in in vitro-produced pre-implantation-stage bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 40:177–183. doi:10.1111/j.1439-0531.2005.00579.x.

Marques, T. C., E. C. da Silva, T. O. Diesel, L. O. Leme, C. F. Martins, M. Dode, B. G. Alves, F. Costa, E. B. de Oliveira, and M. L. Gambarini. 2018. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.* 53:226–236. doi:10.1111/rda.13097

Marques, T. C., E. Santos, T. O. Diesel, C. F. Martins, H. C. B. Cumpa, L. O. Leme, M. A. N. Dode, B. G. Alves, F. P. H. Costa, E. B. Oliveira, et al. 2021. Blastocoel fluid removal and melatonin supplementation in the culture medium improve the viability of vitrified bovine embryos. *Theriogenology*. 160:134–141. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.10.028.

Martins, T., G. Pugliesi, M. Sponchiado, A. M. Gonella-Diaza, O. A. Ojeda-Rojas, F. D. Rodriguez, R. S. Ramos, A. C. Basso, and M. Binelli. 2018. Perturbations in the uterine luminal fluid composition are detrimental to pregnancy establishment in cattle. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 9:70. doi:10.1186/s40104-018-0285-6.

Massague, J. 2012. TGFbeta signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 13:616–630. doi:10.1038/nrm3434.

Mathews, L. S., R. E. Hammer, R. R. Behringer, A. J. D'Ercole, G. I. Bell, R. L. Brinster, and R. D. Palmiter. 1988. Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 123:2827–2833. doi:10.1210/endo-123-6-2827.

Matsui, M., Y. Takahashi, M. Hishinuma, and H. Kanagawa. 1995. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro. *J. Vet. Med. Sci*. 57:1109–1111. doi:10.1292/jvms.57.1109.

Mesalam, A., K. L. Lee, I. Khan, M. M. R. Chowdhury, S. Zhang, S. H. Song, M. D. Joo, J. H. Lee, J. I. Jin, and I. K. Kong. 2019. A combination of bovine serum albumin with insulin-transferrin-sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture medium improves bovine embryo quality and trophoblast invasion by induction of matrix metalloproteinases. *Reprod. Fertil. Dev*. 31:333–346. doi:10.1071/RD18162.

Michael, D. D., I. M. Alvarez, O. M. Ocon, A. M. Powell, N. C. Talbot, S. E. Johnson, and A. D. Ealy. 2006. Fibroblast growth factor-2 is expressed by the bovine uterus and stimulates interferon-tau production in bovine trophectoderm. *Endocrinology* 147:3571–3579. doi:10.1210/en.2006-0234. en.2006-0234

Mihalik, J., P. Rehak, and J. Koppel. 2000. The influence of insulin on the in vitro development of mouse and bovine embryos. *Physiol. Res*. 49:347–354. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11043922/.

Mohan, M., J. R. Malayer, R. D. Geisert, and G. L. Morgan. 2001. Expression of retinol-binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in preattachment bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev*. 60:289–296. doi:10.1002/mrd.1090.

Mohan, M., J. R. Malayer, R. D. Geisert, and G. L. Morgan. 2002. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. *Biol. Reprod*. 66:692–700. doi:10.1095/biolreprod66.3.692.

Moreira, F., F. F. Paula-Lopes, P. J. Hansen, L. Badinga, and W. W. Thatcher. 2002. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*. 57:895–907. doi:10.1016/s0093-691x(01)00694-x.

Moss, J. I., E. Pontes, and P. J. Hansen. 2009. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. *Arch. Toxicol*. 83:1001–1007. doi:10.1007/s00204-009-0458-3.

Munoz, M., F. J. Corrales, J. N. Caamano, C. Diez, B. Trigal, M. I. Mora, D. Martin, S. Carrocera, and E. Gomez. 2012. Proteome of the early embryo-maternal dialogue in the cattle uterus. *J. Proteome Res*. 11:751–766. doi:10.1021/pr200969a.

Namwanje, M., and C. W. Brown. 2016. Activins and inhibins: roles in development, physiology, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 8. doi:10.1101/cshperspect.a021881.

Neira, J. A., D. Tainturier, M. A. Pena, and J. Martal. 2010. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 73:595–604. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.10.015.

Nicola, N. A., and J. J. Babon. 2015. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev*. 26:533–544. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.001.

Niehrs, C. 2012. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 13:767–779. doi:10.1038/nrm3470.

Ornitz, D. M., and N. Itoh. 2015. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol*. 4:215–266. doi:10.1002/wdev.176.

Ozawa, M., Q. E. Yang, and A. D. Ealy. 2013. The expression of fibroblast growth factor receptors during early bovine conceptus development and pharmacological analysis of their actions on trophoblast growth in vitro. *Reproduction*. 145:191–201. doi:10.1530/REP-12-0220.

Palma, G. A., M. Muller, and G. Brem. 1997. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod. Fertil*. 110:347–353. doi:10.1530/jrf.0.1100347.

Pang, Y. W., Y. Q. Sun, W. J. Sun, W. H. Du, H. S. Hao, S. J. Zhao, and H. B. Zhu. 2016. Melatonin inhibits paraquat-induced cell death in bovine preimplantation embryos. *J. Pineal Res*. 60:155–166. doi:10.1111/jpi.12297.

Papis, K., O. Poleszczuk, E. Wenta-Muchalska, and J. A. Modlinski. 2007. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *J. Pineal Res*. 43:321–326. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00479.x.

Park, J. E., H. J. Oh, S. G. Hong, G. Jang, M. K. Kim, and B. C. Lee. 2010. Effects of activin A on the in vitro development and mRNA expression of bovine embryos cultured in chemically-defined two-step culture medium. *Reprod. Domest. Anim*. 45:585–593. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01306.x.

Paula-Lopes, F. F., A. A. de Moraes, J. L. Edwards, J. E. Justice, and P. J. Hansen. 1998. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1beta. *Biol. Reprod*. 59:1406–1412. doi:10.1095/biolreprod59.6.1406.

Pennington, K. A., and A. D. Ealy. 2012. The expression and potential function of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in bovine trophectoderm. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 10:12. doi:10.1186/1477-7827-10-12.

Pereira, R. M., M. C. Baptista, M. I. Vasques, A. E. Horta, P. V. Portugal, R. J. Bessa, J. C. Silva, M. S. Pereira, and C. C. Marques. 2007. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Anim. Reprod. Sci*. 98:293–301. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.03.015.

Phillips, D. J., and D. M. de Kretser. 1998. Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol*. 19:287–322. doi:10.1006/frne.1998.0169.

Prelle, K., M. Stojkovic, K. Boxhammer, J. Motlik, D. Ewald, G. J. Arnold, and E. Wolf. 2001. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and long R(3)IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in in vitro produced bovine embryos. *Endocrinology*. 142:1309–1316. doi:10.1210/endo.142.3.8038.

Pushpakumara, P. G., R. S. Robinson, K. J. Demmers, G. E. Mann, K. D. Sinclair, R. Webb, and D. C. Wathes. 2002. Expression of the Insulin-Like Growth Factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. *Reproduction*. 123:859–868. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12052240/.

Rajput, S. K., C. Yang, M. Ashry, J. K. Folger, J. G. Knott, and G. W. Smith. 2020. Role of bone morphogenetic protein signaling in bovine early embryonic development and stage specific embryotropic actions of follistatin. *Biol. Reprod*. 102:795–805. doi:10.1093/biolre/ioz235.

Rho, N. Y., F. A. Ashkar, T. Revay, P. Madan, G. J. Rho, W. A. King, and L. A. Favetta. 2018. De novo transcription of thyroid hormone receptors is essential for early bovine embryo development in vitro. *Reprod. Fertil. Dev*. 30:779–788. doi:10.1071/RD17165.

Rhoads, M. L., J. P. Meyer, S. J. Kolath, W. R. Lamberson, and M. C. Lucy. 2008. Growth hormone receptor, insulin-like growth factor (IGF)-1, and IGF-binding protein-2 expression in the reproductive tissues of early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci*. 91:1802–1813. doi:10.3168/jds.2007-0664.

Rivera, R. M. 2019. Consequences of assisted reproductive techniques on the embryonic epigenome in cattle. *Reprod. Fertil. Dev*. 32:65–81. doi:10.1071/RD19276.

Robinson, R. S., G. E. Mann, T. S. Gadd, G. E. Lamming, and D. C. Wathes. 2000. The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Endocrinol*. 165:231–243. doi:10.1677/joe.0.1650231.

Rodriguez, A., C. De Frutos, C. Diez, J. N. Caamano, N. Facal, P. Duque, C. Garcia-Ochoa, and E. Gomez. 2007a. Effects of human versus mouse leukemia inhibitory factor on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*. 67:1092–1095. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.11.015.

Rodriguez, A., C. Diez, J. N. Caamano, C. de Frutos, L. J. Royo, M. Munoz, S. Ikeda, N. Facal, M. Alvarez-Viejo, and E. Gomez. 2007b. Retinoid receptor-specific agonists regulate bovine in vitro early embryonic development, differentiation and expression of genes related to cell cycle arrest and apoptosis. *Theriogenology*. 68:1118–1127. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.08.007.

Rodriguez, A., C. Diez, S. Ikeda, L. J. Royo, J. N. Caamano, C. Alonso-Montes, F. Goyache, I. Alvarez, N. Facal, and E. Gomez. 2006. Retinoids during the in vitro transition from bovine morula to blastocyst. *Hum. Reprod*. 21:2149–2157. doi:10.1093/humrep/del099.

Roelen, B. A., M. J. Van Eijk, M. A. Van Rooijen, M. M. Bevers, J. H. Larson, H. A. Lewin, and C. L. Mummery. 1998. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of a bovine transforming growth factor beta (TGF-beta) type I receptor. *Mol. Reprod. Dev*. 49:1–9. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199801)49:1<1::AID-MRD1>3.0.CO;2-U.

Rose-John, S. 2018. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 10. doi:10.1101/cshperspect.a028415.

Saeed-Zidane, M., D. Tesfaye, Y. Mohammed Shaker, E. Tholen, C. Neuhoff, F. Rings, E. Held, M. Hoelker, K. Schellander, and D. Salilew-Wondim. 2019. Hyaluronic acid and epidermal growth factor improved the bovine embryo quality by regulating the DNA methylation and expression patterns of the focal adhesion pathway. *PLoS One* 14:e0223753. doi:10.1371/journal.pone.0223753.

Sakagami, N., H. Umeki, O. Nishino, H. Uchiyama, K. Ichikawa, K. Takeshita, E. Kaneko, K. Akiyama, S. Kobayashi, and H. Tamada. 2012. Normal calves produced after transfer of embryos cultured in a chemically defined medium supplemented with epidermal growth factor and insulin-like growth factor I following ovum pick up and in vitro fertilization in Japanese black cows. *J. Reprod. Dev*. 58:140–146. doi:10.1262/jrd.11-050m.

Sampaio, R. V., S. Conceicao, M. S. Miranda, F. Sampaio Lde, and O. M. Ohashi. 2012. MT3 Melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 10:103. doi:10.1186/1477-7827-10-103.

Sang, L., W. Ortiz, Y. Xiao, E. Estrada-Cortes, E. A. Jannaman, and P. J. Hansen. 2020. Actions of putative embryokines on development of the preimplantation bovine embryo to the blastocyst stage. *J. Dairy Sci*. 103:11930–11944. doi:10.3168/jds.2020-19068.

Scenna, F. N., J. L. Edwards, N. R. Rohrbach, M. E. Hockett, A. M. Saxton, and F. N. Schrick. 2004. Detrimental effects of prostaglandin F2alpha on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 73:215–226. doi:10.1016/j.prostaglandins.2004.02.001.

Schultz, G. A., A. Hogan, A. J. Watson, R. M. Smith, and S. Heyner. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev*. 4:361–371. doi:10.1071/rd9920361.

Seekford, Z. K., L. K. Wooldridge, N. W. Dias, C. L. Timlin, A. F. Sales, S. L. Speckhart, K. G. Pohler, R. R. Cockrum, V. R. G. Mercadante, and A. D. Ealy. 2021. Interleukin-6 Supplementation improves post-transfer embryonic and fetal development of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 170:15–22. doi:10.1016/j.theriogenology.2021.04.004.

Siemieniuch, M. J., M. Majewska, M. Takahashi, M. Sakatani, K. Lukasik, K. Okuda, and D. J. Skarzynski. 2010. Are glucocorticoids auto- and/or paracrine factors in early bovine embryo development and implantation? *Reprod. Biol*. 10:249–256. doi:10.1016/s1642-431x(12)60045-x.

Siqueira, L. G., and P. J. Hansen. 2016. Sex differences in response of the bovine embryo to colony-stimulating factor 2. *Reproduction*. 152:645–654. doi:10.1530/REP-16-0336.

Siqueira, L. G., M. V. G. Silva, J. C. Panetto, and J. H. Viana. 2019. Consequences of assisted reproductive technologies for offspring function in cattle. *Reprod. Fertil. Dev*. 32:82–97. doi:10.1071/RD19278.

Sirisathien, S., and B. G. Brackett. 2003. TUNEL Analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. *Mol. Reprod. Dev*. 65:51–56. doi:10.1002/mrd.10263.

Sirisathien, S., H. J. Hernandez-Fonseca, P. Bosch, B. R. Hollet, J. D. Lott, and B. G. Brackett. 2003a. Effect of leukemia inhibitory factor on bovine embryos produced in vitro under chemically defined conditions. *Theriogenology*. 59:1751–1763. doi:10.1016/s0093-691x(02)01258-x.

Sirisathien, S., H. J. Hernandez-Fonseca, and B. G. Brackett. 2003b. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim. Reprod. Sci*. 77:21–32. doi:10.1016/s0378-4320(02)00272-5.

Smith, L. C., J. Therrien, F. Filion, F. Bressan, and F. V. Meirelles. 2015. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R. *Front. Genet*. 6:58. doi:10.3389/fgene.2015.00058.

Sosa, F., J. Block, Y. Xiao, and P. J. Hansen. 2020. Determinants of survival of the bovine blastocyst to cryopreservation stress: treatment with colony stimulating factor 2 during the morula-to-blastocyst transition and embryo sex. *CABI. Agric. Biosci*. 1. doi:10.1186/s43170-020-00012-9.

Steinhart, Z., and S. Angers. 2018. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development* 145. doi:10.1242/dev.146589.

Stoecklein, K. S., M. S. Ortega, L. D. Spate, C. N. Murphy, and R. S. Prather. 2021. Improved cryopreservation of in vitro produced bovine embryos using FGF2, LIF, and IGF1. *PLoS One* 16:e0243727. doi:10.1371/journal.pone.0243727.

Thompson, J. G., R. J. Partridge, F. D. Houghton, C. I. Cox, and H. J. Leese. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil*. 106:299–306. doi:10.1530/jrf.0.1060299.

Tokarz, V. L., P. E. MacDonald, and A. Klip. 2018. The cell biology of systemic insulin function. *J. Cell Biol*. 217:2273–2289. doi:10.1083/jcb.201802095.

Tominaga, K., Y. Hamada, T. Yabuue, and T. Ariyoshi. 2000. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. *J. Vet Med. Sci*. 62:465–467. doi:10.1292/jvms.62.465.

Tordjman, S., S. Chokron, R. Delorme, A. Charrier, E. Bellissant, N. Jaafari, and C. Fougerou. 2017. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr. Neuropharmacol*. 15:434–443. doi:10.2174/1570159X14666161228122115.

Torres, A. C., D. Boruszewska, M. Batista, I. Kowalczyk-Zieba, P. Diniz, E. Sinderewicz, J. S. Saulnier-Blache, I. Woclawek-Potocka, and L. Lopes-da-Costa. 2014. Lysophosphatidic acid signaling in late cleavage and blastocyst stage bovine embryos. *Mediators Inflamm*. 2014:678968. doi:10.1155/2014/678968.

Tribulo, P., B. H. Bernal Ballesteros, A. Ruiz, A. Tribulo, R. J. Tribulo, H. E. Tribulo, G. A. Bo, and P. J. Hansen. 2017a. Consequences of exposure of embryos produced in vitro in a serum-containing medium to dickkopf-related protein 1 and colony stimulating factor 2 on blastocyst yield, pregnancy rate, and birth weight. *J. Anim. Sci*. 95:4407–4412. doi:10.2527/jas2017.1927.

Tribulo, P., G. Jumatayeva, K. Lehloenya, J. I. Moss, V. M. Negron-Perez, and P. J. Hansen. 2018a. Effects of sex on response of the bovine preimplantation embryo to insulin-like growth factor 1, activin A, and WNT7A. *BMC Dev. Biol*. 18:16. doi:10.1186/s12861-018-0176-2.

Tribulo, P., B. Leao, K. C. Lehloenya, G. Z. Mingoti, and P. J. Hansen. 2017b. Consequences of endogenous and exogenous WNT signaling for development of the preimplantation bovine embryo. *Biol. Reprod*. 96:1129–1141. doi:10.1093/biolre/iox048.

Tribulo, P., J. I. Moss, M. Ozawa, Z. Jiang, X. C. Tian, and P. J. Hansen. 2017c. WNT regulation of embryonic development likely involves pathways independent of nuclear CTNNB1. *Reproduction*. 153:405–419. doi:10.1530/REP-16-0610.

Tribulo, P., M. B. Rabaglino, M. B. Bo, L. R. Carvalheira, J. V. Bishop, T. R. Hansen, and P. J. Hansen. 2019. Dickkopf-related protein 1 is a progestomedin acting on the bovine embryo during the morula-to-blastocyst transition to program trophoblast elongation. *Sci. Rep*. 9:11816. doi:10.1038/s41598-019-48374-z.

Tribulo, P., L. G. B. Siqueira, L. J. Oliveira, T. Scheffler, and P. J. Hansen. 2018b. Identification of potential embryokines in the bovine

reproductive tract. *J. Dairy Sci*. 101:690–704. doi:10.3168/jds.2017-13221.

Trigal, B., E. Gomez, C. Diez, J. N. Caamano, D. Martin, S. Carrocera, and M. Munoz. 2011. In vitro development of bovine embryos cultured with activin A. *Theriogenology*. 75:584–588. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.010.

Ushijima, H., K. Akiyama, and T. Tajima. 2008. Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: in vivo collected and in vitro produced embryos. *J. Reprod. Dev*. 54:239–243. doi:10.1262/jrd.19128.

Vailes, M. T., S. R. McCoski, L. K. Wooldridge, S. T. Reese, K. G. Pohler, D. A. Roper, V. R. Mercadante, and A. D. Ealy. 2019. Post-transfer outcomes in cultured bovine embryos supplemented with epidermal growth factor, fibroblast growth factor 2, and insulin-like growth factor 1. *Theriogenology*. 124:1–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.09.023.

Vejlsted, M., B. Avery, J. O. Gjorret, and P. Maddox-Hyttel. 2005. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on in vitro produced bovine embryos and their outgrowth colonies. *Mol. Reprod. Dev*. 70:445–454. doi:10.1002/mrd.20221.

Viana, J. H. 2019. 2019 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technol Newsletter*. 38:1–15. https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee.

Viuff, D., P. Hyttel, T. Greve, T. Eriksen, and S. Alexandersen. 1995. Transcription and localization of growth factor mRNA in the bovine oviduct. *Mol. Reprod. Dev*. 42:28–34. doi:10.1002/mrd.1080420105.

Wang, F., X. Tian, L. Zhang, C. Gao, C. He, Y. Fu, P. Ji, Y. Li, N. Li, and G. Liu. 2014a. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *J. Pineal Res*. 56:333–342. doi:10.1111/jpi.12126.

Wang, F., X. Tian, Y. Zhou, D. Tan, S. Zhu, Y. Dai, and G. Liu. 2014b. Melatonin improves the quality of in vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. *PLoS One* 9:e93641. doi:10.1371/journal.pone.0093641.

Wang, L. M., H. L. Feng, Y. Ma, M. Cang, H. J. Li, Z. Yan, P. Zhou, J. X. Wen, S. Bou, and D. J. Liu. 2009. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Anim. Reprod. Sci*. 114:99–108. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.019

Wang, R. N., J. Green, Z. Wang, Y. Deng, M. Qiao, M. Peabody, Q. Zhang, J. Ye, Z. Yan, S. Denduluri, et al. 2014c. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes. Dis*. 1:87–105. doi:10.1016/j.gendis.2014.07.005.

Woclawek-Potocka, I., J. Komiyama, J. S. Saulnier-Blache, E. Brzezicka, M. M. Bah, K. Okuda, and D. J. Skarzynski. 2009. Lysophosphatic acid modulates prostaglandin secretion in the bovine uterus. *Reproduction*. 137:95–105. doi:10.1530/REP-08-0209.

Wooldridge, L. K., and A. D. Ealy. 2019. Interleukin-6 Increases inner cell mass numbers in bovine embryos. *BMC Dev. Biol*. 19:2. doi:10.1186/s12861-019-0182-z.

Wooldridge, L. K., and A. D. Ealy. 2021a. Interleukin-6 Promotes primitive endoderm development in bovine blastocysts. *BMC Dev. Biol*. 21:3. doi:10.1186/s12861-020-00235-z.

Wooldridge, L. K., and A. D. Ealy. 2021b. Leukemia inhibitory factor stimulates primitive endoderm expansion in the bovine inner cell mass. *Front. Anim. Sci*. 2:1–9. doi:10.3389/fanim.2021.796489.

Wooldridge, L. K., S. E. Johnson, R. R. Cockrum, and A. D. Ealy. 2019. Interleukin-6 Requires JAK to stimulate inner cell mass expansion in bovine embryos. *Reproduction*. 158(4):303–312. doi:10.1530/REP-19-0286.

Wydooghe, E., S. Heras, J. Dewulf, S. Piepers, E. Van den Abbeel, P. De Sutter, L. Vandaele, and A. Van Soom. 2014. Replacing serum in culture medium with albumin and insulin, transferrin and selenium is the key to successful bovine embryo development in individual culture. *Reprod. Fertil. Dev*. 26:717–724. doi:10.1071/RD13043.

Xie, H., S. Tranguch, X. Jia, H. Zhang, S. K. Das, S. K. Dey, C. J. Kuo, and H. Wang. 2008. Inactivation of nuclear wnt-beta-catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development* 135:717–727. doi:10.1242/dev.015339

Xie, M., S. R. McCoski, S. E. Johnson, M. L. Rhoads, and A. D. Ealy. 2017. Combinatorial effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor 2 and insulin-like growth factor 1 on trophoblast cell proliferation and embryogenesis in cattle. *Reprod. Fertil. Dev*. 29:419–430. doi:10.1071/RD15226.

Yamanaka, Y., F. Lanner, and J. Rossant. 2010. FGF Signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* 137:715–724. doi:10.1242/dev.043471

Yang, B. K., X. Yang, and R. H. Foote. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*. 40:521–530. doi:10.1016/0093-691x(93)90405-t.

Yang, Q. E., S. D. Fields, K. Zhang, M. Ozawa, S. E. Johnson, and A. D. Ealy. 2011a. Fibroblast growth factor 2 promotes primitive endoderm development in bovine blastocyst outgrowths. *Biol. Reprod*. 85:946–953. doi:10.1095/biolreprod.111.093203.

Yang, Q. E., M. I. Giassetti, and A. D. Ealy. 2011b. Fibroblast growth factors activate mitogen-activated protein kinase pathways to promote migration in ovine trophoblast cells. *Reproduction*. 141:707–714. doi:10.1530/REP-10-0541.

Yang, Q. E., S. E. Johnson, and A. D. Ealy. 2011c. Protein kinase C delta mediates fibroblast growth factor-2-induced interferon-tau expression in bovine trophoblast. *Biol. Reprod*. 84:933–943. doi:10.1095/biolreprod.110.087916.

Yaseen, M. A., C. Wrenzycki, D. Herrmann, J. W. Carnwath, and H. Niemann. 2001. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction*. 122:601–610. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11570968/.

Yoshioka, K., and H. Kamomae. 1996. Recombinant human activin A stimulates development of bovine one-cell embryos matured and fertilized in vitro. *Mol. Reprod. Dev*. 45:151–156. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<151::AID-MRD7>3.0.CO;2-S.

Yoshioka, K., M. Takata, T. Taniguchi, H. Yamanaka, and K. Sekikawa. 1998. Differential expression of activin subunits, activin receptors and follistatin genes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev*. 10:293–298. doi:10.1071/r98011.

Yu, B., H. T. A. van Tol, C. H. Y. Oei, T. A. E. Stout, and B. A. J. Roelen. 2021. Lysophosphatidic acid accelerates bovine in vitro-produced blastocyst formation through the Hippo/YAP pathway. *Int. J. Mol. Sci*. 22. doi:10.3390/ijms22115915.

Zhang, K., S. K. Rajput, K. B. Lee, D. Wang, J. Huang, J. K. Folger, J. G. Knott, J. Zhang, and G. W. Smith. 2015. Evidence supporting a role for SMAD2/3 in bovine early embryonic development: potential implications for embryotropic actions of follistatin. *Biol. Reprod*. 93:86. doi:10.1095/biolreprod.115.130278.

Zhenhua, G., S. K. Rajput, J. K. Folger, L. Di, J. G. Knott, and G. W. Smith. 2017. Pre- and peri-/post-compaction follistatin treatment increases in vitro production of cattle embryos. *PLoS One* 12:e0170808. doi:10.1371/journal.pone.0170808.

Zolini, A. M., J. Block, M. B. Rabaglino, P. Tribulo, M. Hoelker, G. Rincon, J. J. Bromfield, and P. J. Hansen. 2020. Molecular fingerprint of female bovine embryos produced in vitro with high competence to establish and maintain pregnancydagger. *Biol. Reprod*. 102:292–305. doi:10.1093/biolre/ioz190.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

veterinary sciences

MDPI

Article

Interferon-Stimulated Gene Expression in Peripheral Blood Leucocytes as a Convenient Prediction Marker for Embryo Status in Embryo-Transferred Japanese Black Cows during the Peri-Implantation Period

Hitomi Yoshino [1,†], Keiichiro Kizaki [1,*], Toh-ichi Hirata [2], Kosuke Iga [3,‡], Hideo Matsuda [4], Tadayuki Yamanouchi [4], Yutaka Hashiyada [4,§], Kei Imai [5], Toshina Ishiguro-Oonuma [1], Tomomi Kanazawa [1], Toru Takahashi [1] and Kazuyoshi Hashizume [1]

[1] Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Iwate, Japan; yoshino1990710@gmail.com (H.Y.); oonumat@iwate-u.ac.jp (T.I.-O.); tomomik@iwate-u.ac.jp (T.K.); tatoru@iwate-u.ac.jp (T.T.); kazuha@iwate-u.ac.jp (K.H.)
[2] Field Science Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Iwate, Japan; hirata@iwate-u.ac.jp
[3] Tohoku Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization, 4 Akahira, Shimo-kuriyagawa, Morioka 020-0198, Iwate, Japan; kosukei@affrc.go.jp
[4] National Livestock Breeding Center, Nishigo 961-8061, Fukushima, Japan; h0matsud@nlbc.go.jp (H.M.); t0yamano@nlbc.go.jp (T.Y.); yhashiy@ishikawa-pu.ac.jp (Y.H.)
[5] Department of Sustainable Agriculture, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyodai-Midorimachi, Ebetsu 069-8501, Hokkaido, Japan; imai@rakuno.ac.jp
* Correspondence: kizaki@iwate-u.ac.jp
† Current address: Kohiruimaki Cow Clinical Service, 63-3 Ohira, Tohoku 039-2683, Aomori, Japan.
‡ Current address: Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization, Ikenodai 2, Tsukuba 305-8602, Ibaraki, Japan.
§ Current address: Department of Bioproduction Science, Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University, Nonoichi 921-8836, Ishikawa, Japan.

check for updates

Citation: Yoshino, H.; Kizaki, K.; Hirata, T.-i.; Iga, K.; Matsuda, H.; Yamanouchi, T.; Hashiyada, Y.; Imai, K.; Ishiguro-Oonuma, T.; Kanazawa, T.; et al. Interferon-Stimulated Gene Expression in Peripheral Blood Leucocytes as a Convenient Prediction Marker for Embryo Status in Embryo-Transferred Japanese Black Cows during the Peri-Implantation Period. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 408. https://doi.org/10.3390/vetsci10070408

Academic Editor: Burim Ametaj

Received: 24 May 2023
Revised: 19 June 2023
Accepted: 20 June 2023
Published: 22 June 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Simple Summary: Practically and economically, predicting pregnancy status is crucial for food animal production. Recently, the expression of interferon-stimulated genes (ISGs) in peripheral blood leukocytes has been examined as a biomarker for predicting the gestational status during maternal recognition in ruminants. Although the ISG levels in the blood cells of cattle have been reported, the practical application of this detection method in embryo-transferred (ET) cows has not been evaluated in detail. The levels of three of the four ISGs in this study were significantly higher in pregnant cows than in non-pregnant cows on day 21 of gestation. The diagnostic performance results showed that the three ISGs are appropriate biomarkers for predicting the gestational status of ET cows. The statistical evaluation of diagnostic accuracy in ET cows indicated that the values of sensitivity, specificity, and accuracy were very high and the positive predictive values of the three ISGs were estimated. The results of this study suggest that ISGs are good biomarkers for gestational status during the peri-implantation period in ET cattle.

Abstract: Pregnancy diagnosis during early gestation is important for cattle reproduction. The expression of interferon-stimulated genes (ISGs) in peripheral blood leukocytes (PBLs) was studied in embryo-transferred (ET) Japanese Black cattle. ISGs in PBLs—*ISG15*, *MX1*, *MX2*, and *OAS1*—were detected in multiple ovulation ET cattle using a real-time quantitative polymerase chain reaction, and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed. Gestational status was predicted using the average ISG levels during the normal estrous cycle (AVE) and the Youden index from the ROC curve analysis as cutoff values. The *ISG15*, *MX1*, and *MX2* levels were significantly higher in pregnant cattle ($n = 10$) than in non-pregnant cattle ($n = 23$) on gestation day 21, whereas the levels of all ISGs were similar between non-pregnant and non-pregnant cattle with late embryonic death ($n = 7$). *ISG15*, *MX1*, and *MX2* appropriately predicted the gestational status of ET cows. The statistical evaluation of the diagnostic accuracy in ET cows on day 21 of gestation presented

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

higher values of sensitivity, specificity, accuracy, and positive predictive values of *ISG15*, *MX1*, and *MX2* using the Youden index than using the AVE. Therefore, *ISG15*, *MX1*, and *MX2* are excellent biomarkers of gestational status during the peri-implantation period in ET cattle.

Keywords: pregnancy diagnosis; gestational status; biomarker

1. Introduction

Interferon-tau (IFNT) is a unique molecule derived from trophoblastic cells in ruminants and is specifically produced during the early gestational period [1–3]. IFNT exerts an anti-luteolytic effect on the corpus luteum by attenuating the secretion of prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) in the endometrium, and PGF2 alpha secretion is mediated by the downregulation of oxytocin receptors in uterine epithelial cells [1–3]. IFNT not only stimulates endometrial and luteal cells but also other cells, such as hepatocytes and blood cells [3–7]. It recognizes gestation and plays an immunological role in preventing infections and embryo–maternal interactions [8,9]. It plays a crucial role in the regulation of embryonic and endometrial factors during early gestation in ruminants.

Interferon-stimulated genes (ISGs) are induced in response to interferon (IFN) [10]. IFNT, a type I IFN, binds to the cell-surface heterodimeric interferon alpha and beta receptor (IFNAR) 1/IFNAR2 complex [3]. IFNT signaling, through the Janus kinase/signal transducer and the activator of the transcription (JAK/STAT) pathway, involves a transcriptional heterotrimer consisting of phosphorylated STAT1/STAT2 and interferon regulatory factor (IRF9) [3]. Activated interferon regulatory factor 3, which consists of phosphorylated STAT1/STAT2 and IRF9, translocates to the nucleus and promotes gene transcription by binding to IFN-stimulated response elements in the upstream promoter regions of ISGs [11]. It was previously considered that there are several hundred ISGs; however, in recent years, it has been predicted that approximately 10% of the genes in the genome are regulated by IFN [12]. ISG15 ubiquitin-like modifier (*ISG15*), MX dynamin-like GTPase 1 (*MX1*), *MX2*, and 2′–5′ oligoadenylate synthetase 1 (*OAS1*), which are the focus of the present study, are typical ISGs [11]. ISGs and their related molecules coordinate the establishment of feto–maternal interactions and simultaneously stimulate blood cells. This specific response could be beneficial for predicting the gestational status of cattle during the early peri-implantation period, because IFNT plays specific roles in ruminants [2]. These complex events appear to be closely related to ISG expression in blood cells during maternal recognition.

Predicting pregnancy status is essential for animal food production, both practically and economically. Various methods of gestational prediction, including rectal palpation, ultrasonography, blood progesterone level measurement, and estrus detection, have been used to address this critical issue in cattle [13–15]. The detection of return to estrus on days 18–32 post-artificial insemination (AI) is the easiest method for identifying non-pregnant cattle [13]; however, this method is not sufficiently accurate for pregnancy diagnosis owing to its low efficiency (<50%) [16]. Diagnosis based on the rectal palpation of the ovary and uterus is the most widely used method, and it is performed correctly as early as 35 days post-AI [13,14]. Recently, portable brightness (B)-mode ultrasonography has been reported to be a widespread method, and it has been used to correctly detect early pregnancy 27 days post-AI under real-world conditions [13,17]. Moreover, indirect methods, such as the measurement of progesterone concentrations and pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in milk and blood, have been developed [13–15]. Profiling progesterone concentrations on days 18–24 post-AI could be an effective method for identifying non-pregnant cattle [13]. However, non-pregnant cattle with an extended luteal phase are diagnosed as pregnant. Thus, progesterone tests are inadequate for the identification of pregnant cattle [13]. PAGs are secreted by the binucleated trophoblast cells in the placenta, and their levels increase from 15 to 35 days of gestation in cattle [13,18]. Assay kits for milk

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

and blood PAG levels have recently been commercialized. The PAG levels in milk and blood are reliable indicators for pregnancy diagnosis approximately 26–30 days post-AI [13,14].

In the above-mentioned studies, correct diagnosis was made after the period of normal return to estrus, and thus, early rebreeding opportunities were probably lost in non-pregnant cattle. Therefore, establishing pregnancy diagnosis methods before the end of the estrous cycle is required to improve reproductive efficiency. In addition, the detection and prediction of pregnancy loss (late embryonic death or abortion) after a single early pregnancy diagnosis are difficult; thus, multiple examinations are required to confirm pregnancy status. However, IFNT is a specific molecule that is difficult to use as a gestation prediction signal during the early implantation periods; that being said, it plays a role later on [1,2,19]. Recently, ISG expression in peripheral blood leukocytes (PBLs) has been examined as a biomarker for predicting the gestational status during maternal recognition in ruminants [20–22]. The prediction efficiency of ISGs, specifically *ISG15* and *MX2*, for the establishment of gestation has been confirmed as reliable biomarkers in cattle [21,23–26].

Embryo transfer is an assisted reproductive technology that is distinct from AI and has been developed and used in the food and livestock industries [14,27]. Embryo transfer is a method used to promote livestock improvement and produce animals with a high market value; however, the conception rate remains to be improved because only around half of embryo transfers succeed in practice [28–30]. In embryo transfer, as in AI, early pregnancy diagnosis, especially the identification of non-pregnant cattle, increases the chance of insemination and shortens the calving interval, consequently improving reproductive efficiency. *ISG15* expression in PBLs, a biomarker for predicting gestational status during maternal recognition, has been reported to increase in embryo transferred (ET) cows [31,32]. However, the practical applications of this detection method have not yet been evaluated in detail.

Therefore, in this study, we aimed to clarify the expression patterns of four ISGs [*ISG15*, *MX1*, *MX2*, and *OAS1*] in the PBLs of multiple ovulation embryo transfer (MOET) cattle on day 21 after estrus (14 days after embryo transfer) and to verify a method for predicting pregnancy status in ET Japanese Black (JB) cattle during the peri-implantation period.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The Iwate University Laboratory Animal Care and Use Committee approved the experimental and feeding conditions of the cattle used in this study (approval numbers: A201244, A201434, and A201701). Twenty-two heifers and eighteen parous JB cattle (n = 40) from an experimental farm were used in this study. Bovine blastocysts were produced on day 7 using the MOET technique [33]. Transferable embryos, identified according to the International Embryo Transfer Society manual as either code 1 or 2 single blastocysts on day 7 after insemination, were transferred to the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum horn of each synchronized recipient on day 7 after estrus, as previously reported [34]. Recipient estrous behavior was observed at least twice daily, in the morning and evening. Peripheral blood was collected on day 21 of gestation (14 days after embryo transfer). The pregnancy status was confirmed on days 30 and 60 of gestation using ultrasonographic detection (UD). In the present study, three different categories of cows, namely, 10 pregnant ET cows, 23 non-pregnant cows, and 7 cows that were non-pregnant with late embryonic death, were included from the experimental farm. In pregnant ET cows, the conceptus was observed using UD at approximately 30 days (23 days after embryo transfer) and 60 days of gestation. Conversely, in non-pregnant ET cows, no conceptuses were observed at approximately 30 and 60 days. Pregnancy loss in cows in the present study occurred after a conceptus was observed on day 30 of gestation. Thus, the conceptus was observed on day 30 but not on day 60 in the late embryonic death group.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

2.2. Sample Collection, RNA Extraction, and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Blood collection, RNA extraction, and RT-qPCR were performed as previously described [26]. Approximately 3 mL of peripheral blood was collected in PAXgene blood RNA tubes (Qiagen, Hilden, Germany) and incubated at room temperature for 2 h. RNA was extracted using an RNA extraction kit (PAXgene Blood RNA Kit; Qiagen). RNA samples were evaluated using a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and treated with DNase (TURBO DNA-free Kit; Ambion, Austin, TX, USA) to remove contaminating genomic DNA. Reverse transcription was performed using 1 µg of total RNA with random primers and a high-capacity reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The reverse transcription cycle was performed at 25 °C for 10 min, 37 °C for 120 min, and 85 °C for 5 s in a thermal cycler. PCR analysis was performed using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) on the ABI7300 real-time PCR system (Applied Biosystems), as previously described [24]. The primers used to amplify each gene are listed in Table 1 [24]. The amplification conditions were as follows: initial sample incubation at 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, with the collection of fluorescence signals at the end of each cycle. The melting curve for detecting the SYBR Green-based objective amplicon was confirmed at 65 to 95 °C in 0.5 °C increments. To quantify the concentration of each mRNA, standard curves were generated via the serial dilution of a plasmid containing the corresponding cDNA, as previously described [22]. For standard plasmid preparation, PCR fragments were subcloned into the pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions, and the sequences of the cloned plasmid containing cDNA were analyzed using the ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). In addition, the mRNA expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used as a reference gene for the normalization of internal expression in the samples. The expression of beta-actin and ribosomal protein L27, in addition to that of *GAPDH*, was also examined to evaluate their use as reference genes for RT-qPCR. The results showed no significant differences in their expression. Quantitative PCR was performed according to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines [35].

Table 1. Primer sequences for RT-qPCR.

Gene	Accession Number	Strand	Sequence (5′–3′)
ISG15	NM_174366	Forward	GCAGACCAGTTCTGGCTGTCT
		Reverse	CCAGCGGGTGCTCATCAT
MX1	NM_173940	Forward	GAGGTGGACCCCCAAGGA
		Reverse	CCACCAGATCGGGCTTTGT
MX2	NM_173941	Forward	GGGCAGCGGAATCATCAC
		Reverse	CTCCCGCTTTGTCAGTTTCAG
OAS1	NM_178108	Forward	CCAAGTCAAACAAGCCATCGA
		Reverse	CACATCGGAAACACCTCTCCTT
GAPDH	NM_001034034	Forward	AAGGCCATCACCATCTTCCA
		Reverse	CCACCACATACTCAGCACCAGCAT

2.3. Estimation of Threshold Values

The average values (AVE) of normalized ISG expression levels during the estrous cycle in JB cattle have been previously reported [26] as follows: *ISG15*, 0.174; *MX1*, 0.065; *MX2*, 0.098; and *OAS1*, 0.351. ISG expression levels on day 21 of gestation in ET cows were used to construct a receiver operating characteristic (ROC) curve. According to the RT-qPCR experiments in the present study, the reference cDNA for *ISG15*, *MX1*, *MX2*, and *OAS1* and cDNA sample synthesized from PBL RNA were measured simultaneously to allow a comparison with AVE values obtained in previous studies. The natural logarithm

MAJALAH EDISI 12 TAHUN 2023, DESEMBER 2023 Halaman 360

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

area under the ROC curve (AUC) were estimated using JMP software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The AVE and Youden index were used as threshold values to predict the accuracy of pregnancy diagnosis in ET cows on day 21 of gestation. The results were as follows: true positive (TP), where the pregnancy status was determined as positive using the cutoff value of AVE or the Youden index and with the use of UD at around 60 days of gestation; false positive (FP), where the pregnancy status was determined as positive using the cutoff value of AVE or the Youden index but negative using UD; true negative (TN), where the pregnancy status was determined as negative using both cutoff value of AVE or the Youden index and UD; and false negative (FN), where the pregnancy status was determined as negative using the cutoff value of AVE or the Youden index but positive using UD. The sensitivity (TP/(TP + FN) × 100 (probability of a diagnosis of pregnancy among cows that were actually pregnant)), specificity)TN/(TN + FP) × 100 (probability that cows were diagnosed as non-pregnant)), positive predictive value (PPV; TP/(TP + FP) × 100), and negative predictive value (NPV; TN/(TN + FN) × 100) were calculated. The accuracy of pregnancy determination, (TP + TN)/(TP + FP + TN + FN) × 100, was evaluated by calculating the diagnostic accuracy.

2.4. Statistical Analysis

Gene expression was measured using RT-qPCR and analyzed using Kruskal–Wallis test, followed by Steel–Dwass test, using JMP 7 software. Results with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Classical ISG Expression in ET Cattle and ROC Curve Analysis

The expression of *ISG15*, *MX1*, and *MX2* was significantly higher in pregnant cattle than in non-pregnant cattle on day 21 of gestation; however, no differences were observed in *OAS1* expression (Table 2). The expression of most ISGs was similar between the non-pregnant and late embryonic death groups.

Table 2. Expression of interferon-stimulated genes (ISGs) in peripheral blood leukocytes (PBLs) of pregnant and non-pregnant embryo-transferred Japanese Black (JB) cattle on day 21 of gestation (14 days after embryo transfer).

Group	*n*	*ISG15*	*MX1*	*MX2*	*OAS1*
Pregnant	10	0.71 ± 0.10 [a]	0.28 ± 0.03 [a]	0.64 ± 0.09 [a]	0.66 ± 0.19
Non-pregnant	23	0.20 ± 0.05 [b]	0.13 ± 0.02 [b]	0.25 ± 0.06 [b]	0.37 ± 0.06
Non-pregnant with late embryonic death	7	0.26 ± 0.12 [b]	0.15 ± 0.03 [b]	0.27 ± 0.09 [b]	0.18 ± 0.04

Values are shown as copy number of gene/*GAPDH* (average ± SE). Different letters indicate significant differences between the pregnant, non-pregnant, and non-pregnant with late embryonic death groups based on Kruskal–Wallis test followed by Steel–Dwass test ($p < 0.05$). *ISG15*, interferon-stimulated gene 15; *MX1* and *MX2*, MX dynamin like GTPases 1 and 2; *OAS1*, 2′-5′ oligoadenylate synthetase 1; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

To determine a more suitable predictive marker for embryonic status, specifically in ET cattle, ISG expression levels in PBL were estimated and evaluated using the ROC curve analysis (Figure 1 and Table 3).

Table 3. Area under the curve (AUC) and the Youden index cutoff values estimated using receiver operating characteristic analysis in embryo-transferred JB cattle on day 21 of gestation (14 days after embryo transfer).

Value	*ISG15*	*MX1*	*MX2*	*OAS1*
AUC	0.903	0.883	0.883	0.623
Youden index	0.386	0.174	0.380	0.986

AUC values were considered high when 0.9 < AUC < 1, moderate when 0.7 < AUC < 0.9, low when 0.5 < AUC < 0.7, and nonpredictive when AUC < 0.5 [36,37].

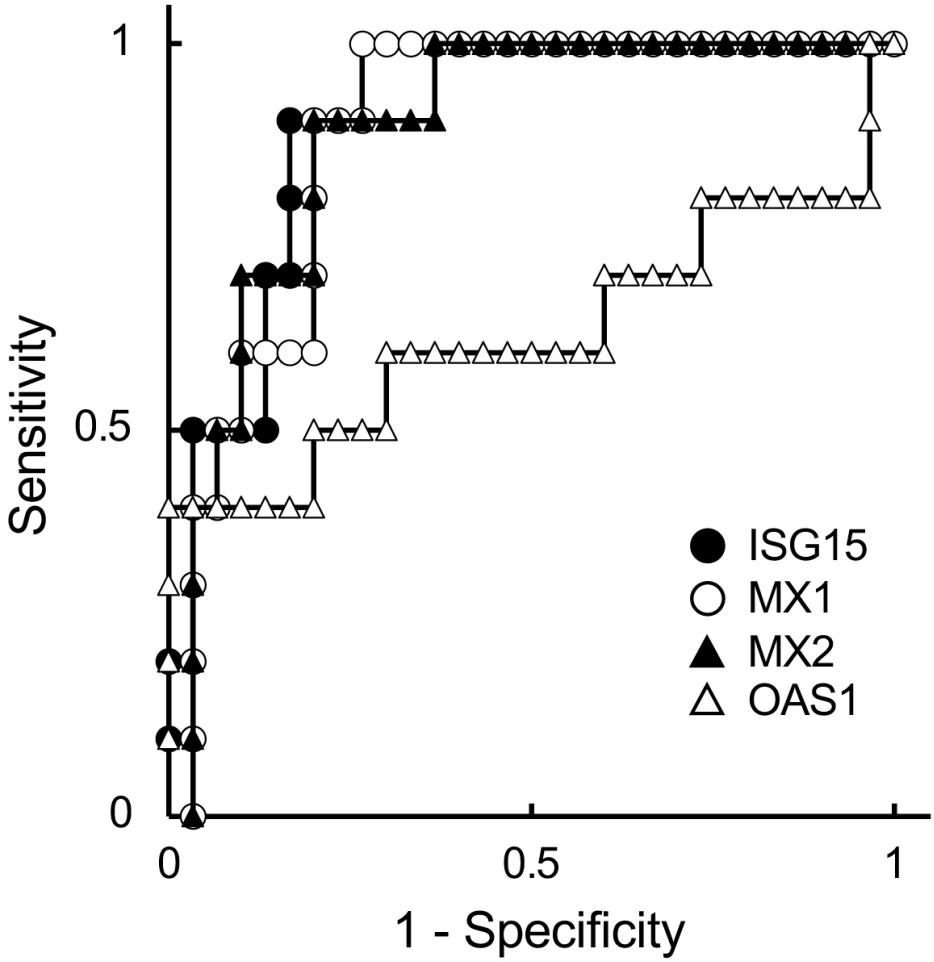


Figure 1. Receiver operating characteristic (ROC) curves of expression of ISGs in embryo-transferred JB cattle on day 21 of gestation. The expressions of *ISG15* (closed circle), *MX1* (open circle), *MX2* (closed triangle), and *OAS1* (open triangle) were analyzed using ROC curves. The horizontal and vertical axes are 1-specificity and sensitivity, respectively. Therefore, the upper-left corner is the ideal point with 100% sensitivity and specificity.

We used the values of the non-pregnant and non-pregnant with late embryonic death groups for ROC curve analysis because the ISG levels were not different between these groups (Table 2). The ROC curve showed that all ISG levels, except the *OAS1* level, appropriately predicted the gestational status on day 21 (Figure 1). The AUC values of ISGs were categorized as high or nearly high (Table 3).

3.2. Prediction of Gestational Statuses during the Peri-Implantation Period in ET Cattle

The gestational status during the peri-implantation period in ET cattle was predicted using conventional cutoff values (AVE) for ISGs, which were estimated from a previous study [26], and the Youden index cutoff values were estimated using the ROC curve analysis (Table 3). When applying the AVE values of the ISGs to predict gestational status on day 21 of gestation, the sensitivity was relatively higher (60.0–100%), but the specificity and accuracy values (10.0–66.6%) were lower than those determined using the Youden index (Table 4). For *ISG15*, *MX1*, and *MX2*, the sensitivity, specificity, and accuracy of the Youden index were 80% or higher. Each NPV showed high values estimated using AVE and the Youden index methods.

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

Table 4. Predicted values on day 21 of gestation (14 days after embryo transfer) estimated using AVE and the Youden index in JB cattle.

	Threshold Value = AVE				Threshold Value = Youden Index			
	ISG15	*MX1*	*MX2*	*OAS1*	*ISG15*	*MX1*	*MX2*	*OAS1*
TP	10	10	10	6	8	9	9	4
FP	11	27	19	10	5	6	6	0
FN	0	0	0	4	2	1	1	6
TN	19	3	11	20	25	24	24	30
Sensitivity [a]	100	100	100	60.0	80.0	90.0	90.0	40.0
Specificity [b]	63.3	10.0	36.7	66.6	83.3	80.0	80.0	100
Accuracy	72.5	32.5	52.5	65.0	82.5	82.5	82.5	85.0
PPV	47.6	27.0	34.5	37.5	61.5	60.0	60.0	100
NPV	100	100	100	83.3	93.6	96.0	96.0	83.3

AVE, average value; TP, number of true positive cows; FP, number of false positive cows; FN, number of false negative cows; TN, number of true negative cows; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value. The average values of the ISGs during the estrous cycle (Yoshino et al., 2020) and the Youden index were used as threshold values. Each value was estimated using the formula presented in the Materials and Methods Section. The sensitivity, specificity, accuracy, PPV, and NPV are shown as percentages. [a] Sensitivity indicates the probability that the cows that were truly pregnant were diagnosed as pregnant. [b] Specificity indicates the probability that the cows were diagnosed as non-pregnant.

4. Discussion

Indicators of gestational prediction are practically and economically crucial for domestic cattle reproduction. We established the accuracy of ISG expression in PBLs as predictive evidence in artificially inseminated Holstein and JB cattle [25,26] and applied this method to JB cows in the current study. First, the expression of ISGs in PBLs was examined to determine the suitability of the practical application of blood ISG levels as indicators of gestation prediction during the peri-implantation phase. Ten pregnant, twenty-three non-pregnant, and seven non-pregnant cows with late embryonic death were used to predict the gestational status of ET cows using ISG values. The fertility rates of the flock were low but presented a convenient model for late embryonic loss and/or death.

On day 21 of pregnancy, the levels of *ISG15*, *MX1*, and *MX2* in PBLs were considerably higher in the pregnant group than in the non-pregnant group, similar to those reported by previous studies on AI [25]. Therefore, the reliability of ISG cutoff values was assessed in ET cows to predict the gestational status during the peri-implantation interval. The Youden index has been used to estimate the cutoff values for different physiological and pathological statuses using ROC curves [29,30]. The use of previously reported AVE ISG cutoff values [19] and the reliability of this technique were confirmed using ROC and the Youden index analyses in the present study, and the application of AVE cutoff values confirmed the credibility of the method. Using the AVE in ET JB cattle on day 21 of gestation, high sensitivity and NPV were observed, but the specificity, accuracy, and PPV were low. The Youden index cutoff method had higher specificity and accuracy than the AVE estimation. The AUC, obtained using the ROC curve analysis, indicated the accuracy of these predictions with high AUC values [36,37]. The values of *ISG15*, *MX1*, and *MX2* on day 21 were approximately 0.9 in ET cows and were almost the same as those in previous studies on AI cattle [26]. In previous studies, the differences in ISG level, specifically *ISG15* and *MX2*, between pregnant and non-pregnant cattle implied that they could be prominent indicators for predicting the gestation status in artificially inseminated Holstein and JB cattle [25,26]. However, *MX1* is not a suitable indicator when applying the AVE cutoff value for prediction because of its low specificity, precision, and PPV. However, by applying the Youden index to the cutoff value, *MX1* can also be used as an appropriate indicator, equivalent to *ISG15* and *MX2*. Therefore, *ISG15*, *MX1*, and *MX2* may be suitable indicators of pregnancy in ET cattle.

Interestingly, similar blood ISG levels were observed in the non-pregnant and late embryonic/fetal death groups in the present study. These results pose a simple question: why?

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

was the gene expression different between pregnant and non-pregnant cattle with late embryonic death on day 21 of gestation? This question arises because both groups would have had a conceptus around day 21. The ISG levels may reflect embryonic morphological changes during the implantation process [38,39]. The ISG levels in the non-pregnant and late embryonic death groups were similar in ET cattle on day 21, which may indicate the embryo development status. Embryos at approximately 17–19 days of gestation significantly change their shapes and activities, and the expanded fetal membrane covers the entire endometrial surface during the critical period of implantation [3,38,40]. The discrepancy in ISG level between the pregnant and non-pregnant late embryonic death groups suggests insufficient IFNT secretion by the embryos in the late embryonic death group.

In domestic cattle reproduction, the true fertility rate is crucial for farmers who expect their cows to become pregnant as soon as possible after calving. Although various new technologies and strategies, such as superovulation, in vitro fertilization, and embryo transfer, have been applied to improve lifetime production in the cattle industry over the last several decades, embryo loss or death after fertilization remains a major issue, especially at 3–4 weeks [19]. Novel and cutting-edge techniques, such as embryo transfer, would be helpful in improving fertility in not only cattle but also other mammalian species, including humans, and their successful management should be considered. The results of the current study showed that the conceptus was observed using ultrasonography at around 30 days in both pregnant and late embryonic death groups. However, the ISG levels of the late embryonic death group on day 21 were lower than those of the pregnant group. It is important to determine whether embryos are dead, alive, or developing well. This means that some indicators are needed to determine the embryonic conditions. We expect that ISG detection methods in PBL will be useful in solving challenging issues. Unlike positive prediction, the negative prediction of gestational status in embryo transfer was reliable and ISGs were detectable in PBLs 14 days after embryo transfer. The application of ISG expression in PBLs during the peri-implantation period will provide accurate information under these circumstances. However, the sample size in the current study was small and none of the data on different days of the peri-implantation period, except for day 21 in ET cattle, were sufficient for gestational prediction. Further studies using more animals around peri-implantation are necessary to confirm the reliability of this theory regarding high gene expression in ET cattle.

There are several practical methods for evaluating gestational status during early gestation, including serum progesterone and pregnancy-associated protein B measurements, and transrectal palpation. However, the prediction of gestational status in ET cattle is still difficult during the implantation period [14,41,42]. Specific gene expression in PBLs may be a reliable predictive method for determining the pregnancy status. Although this procedure may be reliable because the ISG prediction method has been established and used in cattle and other ruminants, we do not have sufficient information to identify PBLs that respond to *ISG15*, *MX1*, *MX2*, and/or *OAS1* [22]. The association between the patterns of gene expression in PBLs and indicators of different physiological circumstances is clear [24,25,43,44]. Further studies on the specificity of each gene are required to understand the precise responses to particular ISG molecules and the detailed roles of ISGs in the development of early stage embryos.

5. Conclusions

Classical ISGs, specifically *ISG15*, *MX1*, and *MX2*, are excellent biomarkers for predicting the non-pregnancy status during the peri-implantation period in ET JB cattle. These biomarkers may be reliable for the negative prediction of gestation during embryo transfer but are less reliable for establishing positive predictions. In addition, the expression of ISGs in the PBLs provides early gestational information during the recognition of gestation, regardless of the conception method in cattle.

Author Contributions: Conceptualization, H.Y., K.K. and K.H.; methodology, H.Y., K.K. and K.H.; formal analysis, K.K.; investigation, H.Y. and K.K.; resources, T.-i.H., K.I. (Kosuke Iga), H.M., T.Y., Y.H., K.I. (Kei Imai), T.I.-O. and T.T.; data curation, H.Y., K.K. and K.H.; writing—original draft preparation, H.Y., K.K. and K.H.; writing—review and editing, H.Y., T.K., K.K. and K.H.; visualization, K.K.; supervision, K.K. and K.H.; project administration, K.K. and K.H.; funding acquisition, K.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Research Program on Innovative Technologies for Animal Breeding, Reproduction, and Vaccine Development of the MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY, AND FISHERIES of Japan, grant number REP-1003.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board of IWATE UNIVERSITY (approval numbers: A201244, A201434, and A201701)" for studies involving animals.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank Fumiyo Taguchi and Mariko Sato for extracting RNA from bovine blood.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Martal, J.; Chêne, N.; Camous, S.; Huynh, L.; Lantier, F.; Hermier, P.; L'Haridon, R.; Charpigny, G.; Charlier, M.; Chaouat, G. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: The role of IFN-τ and other cytokines in early pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* **1997**, *9*, 355–380. [CrossRef] [PubMed]
2. Roberts, R.M. Conceptus inferteons and maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.* **1989**, *40*, 449–452. [CrossRef] [PubMed]
3. Hansen, T.R.; Sinedino, L.D.P.; Spencer, T.E. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). *Reproduction* **2017**, *154*, F45–F59. [CrossRef] [PubMed]
4. Shirasuna, K.; Matsumoto, H.; Matsuyama, S.; Kimura, K.; Bollwein, H.; Miyamoto, A. Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy. *Reproduction* **2015**, *150*, 217–225. [CrossRef] [PubMed]
5. Wijma, R.; Stangaferro, M.L.; Kamat, M.M.; Vasudevan, S.; Ott, T.L.; Giordano, J.O. Embryo mortality around the period of maintenance of the corpus luteum causes alterations to the ovarian function of lactating dairy cows. *Biol. Reprod.* **2016**, *95*, 112. [CrossRef]
6. Ruhmann, B.; Giller, K.; Hankele, A.K.; Ulbrich, S.E.; Schmicke, M. Interferon-τ induced gene expression in bovine hepatocytes during early pregnancy. *Theriogenology* **2017**, *104*, 198–204. [CrossRef]
7. Alhussien, M.N.; Kamboj, A.; Aljader, M.A.; Panda, B.S.K.; Yadav, M.L.; Sharma, L.; Mohammed, S.; Sheikh, A.A.; Lotfan, M.; Kapila, R.; et al. Effect of tropical thermal stress on peri-implantation immune responses in cows. *Theriogenology* **2018**, *114*, 149–158. [CrossRef]
8. Forde, N.; Bazer, F.W.; Spencer, T.E.; Lonergan, P. 'Conceptualizing' the endometrium: Identification of conceptus-derived proteins during early pregnancy in cattle1. *Biol. Reprod.* **2015**, *92*, 156. [CrossRef]
9. Bazer, F.W.; Thatcher, W.W. Chronicling the discovery of interferon tau. *Reproduction* **2017**, *154*, F11–F20. [CrossRef]
10. Au-Yeung, N.; Horvath, C.M. Transcriptional and chromatin regulation in interferon and innate antiviral gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2018**, *44*, 11–17. [CrossRef]
11. Williams, B.R.G.; Williams, B.R.G. Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
12. Schoggins, J.W. Interferon-stimulated genes: What do they all do? *Annu. Rev. Virol.* **2019**, *6*, 567–584. [CrossRef]
13. Fricke, P.M.; Ricci, A.; Giordano, J.O.; Carvalho, P.D. Methods for and implementation of pregnancy diagnosis in dairy cows. *Vet. Clin. North Am.-Food Anim. Pract.* **2016**, *32*, 165–180. [CrossRef] [PubMed]
14. Stevenson, J.S.; Britt, J.H. A 100-year review: Practical female reproductive management. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 10292–10313. [CrossRef] [PubMed]
15. Ott, T.L. Symposium review: Immunological detection of the bovine conceptus during early pregnancy. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 3766–3777. [CrossRef] [PubMed]
16. Senger, P.L. The estrus detection problem: New concepts, technologies, and possibilities. *J. Dairy Sci.* **1994**, *77*, 2745–2753. [CrossRef]
17. Quintela, L.A.; Barrio, M.; Peña, A.I.; Becerra, J.J.; Cainzos, J.; Herradón, P.G.; Díaz, C. Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* **2012**, *47*, 34–44. [CrossRef]
18. Filho, R.V.O.; Franco, G.A.; Reese, S.T.; Dantas, F.G.; Fontes, P.L.P.; Cooke, R.F.; Rhinehart, J.D.; Thompson, K.W.; Pohler, K.G. Using pregnancy associated glycoproteins (PAG) for pregnancy detection at day 24 of gestation in beef cattle. *Theriogenology* **2020**, *151*, 128–133. [CrossRef]

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

19. Hansen, P.J. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—Why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, skaa288. [CrossRef]
20. Gifford, C.; Racicot, K.; Clark, D.S.; Austin, K.J.; Hansen, T.R.; Lucy, M.C.; Davies, C.J.; Ott, T.L. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 274–280. [CrossRef]
21. Green, J.C.; Okamura, C.S.; Poock, S.E.; Lucy, M.C. Measurement of interferon-tau (IFN-τ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, *121*, 24–33. [CrossRef] [PubMed]
22. Kizaki, K.; Shichijo-Kizaki, A.; Furusawa, T.; Takahashi, T.; Hosoe, M.; Hashizume, K. Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2013**, *11*, 6. [CrossRef] [PubMed]
23. Stevenson, J.L.; Dalton, J.C.; Ott, T.L.; Racicot, K.E.; Chebel, R.C. Correlation between reproductive status and steady-state messenger ribonucleic acid levels of the myxovirus resistance gene, MX2, in peripheral blood leukocytes of dairy heifers. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 2163–2172. [CrossRef] [PubMed]
24. Toji, N.; Shigeno, S.; Kizaki, K.; Koshi, K.; Matsuda, H.; Hashiyada, Y.; Imai, K.; Takahashi, T.; Ishiguro-Oonuma, T.; Hashizume, K. Evaluation of interferon-stimulated genes in peripheral blood granulocytes as sensitive responders to bovine early conceptus signals. *Vet. J.* **2017**, *229*, 37–44. [CrossRef]
25. Yoshino, H.; Toji, N.; Sasaki, K.; Koshi, K.; Yamagishi, N.; Takahashi, T.; Ishiguro-Oonuma, T.; Matsuda, H.; Yamanouchi, T.; Hashiyada, Y.; et al. A predictive threshold value for the diagnosis of early pregnancy in cows using interferon-stimulated genes in granulocytes. *Theriogenology* **2018**, *107*, 188–193. [CrossRef]
26. Yoshino, H.; Kizaki, K.; Iga, K.; Hirata, T.; Matsuda, H.; Yamanouchi, T.; Hashiyada, Y.; Toji, N.; Ishiguro-Oonuma, T.; Takahashi, T.; et al. Use of a prediction method for early pregnancy status utilizing receiver operating characteristic curve analysis of peripheral blood leukocyte interferon-stimulated genes in Japanese-black cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **2020**, *214*, 106283. [CrossRef]
27. Hasler, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in north america, and personal reminisces. *Theriogenology* **2014**, *81*, 152–169. [CrossRef]
28. Hashiyada, Y.; Okada, M.; Imai, K. Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from in vivo-cultured in vitro-fertilized embryos. *J. Reprod. Dev.* **2005**, *51*, 749–756. [CrossRef]
29. Geary, T.W.; Burns, G.W.; Moraes, J.G.N.; Moss, J.I.; Denicol, A.C.; Dobbs, K.B.; Ortega, M.S.; Hansen, P.J.; Wehrman, M.E.; Neibergs, H.; et al. Identification of beef heifers with superior uterine capacity for pregnancy. *Biol. Reprod.* **2016**, *95*, 47. [CrossRef]
30. Ealy, A.D.; Wooldridge, L.K.; McCoski, S.R. Board invited review: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *J. Anim. Sci.* **2019**, *97*, 2555–2568. [CrossRef]
31. Matsuyama, S.; Kojima, T.; Kato, S.; Kimura, K. Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2012**, *10*, 21. [CrossRef] [PubMed]
32. Hirayama, H.; Moriyasu, S.; Kageyama, S.; Sawai, K.; Takahashi, H.; Geshi, M.; Fujii, T.; Koyama, T.; Koyama, K.; Miyamoto, A.; et al. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology* **2014**, *81*, 1108–1115. [CrossRef]
33. Hiraizumi, S.; Nishinomiya, H.; Oikawa, T.; Sakagami, N.; Sano, F.; Nishino, O.; Kurahara, T.; Nishimoto, N.; Ishiyama, O.; Hasegawa, Y.; et al. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle–stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days. *Theriogenology* **2015**, *83*, 466–473. [CrossRef]
34. Sugimura, S.; Akai, T.; Somfai, T.; Hirayama, M.; Aikawa, Y.; Ohtake, M.; Hattori, H.; Kobayashi, S.; Hashiyada, Y.; Konishi, K.; et al. Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: A novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biol. Reprod.* **2010**, *83*, 970–978. [CrossRef] [PubMed]
35. Bustin, S.; Benes, V.; Garson, J.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611–622. [CrossRef] [PubMed]
36. Hanley, J.A.; McNeil, B.J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* **1982**, *143*, 29–36. [CrossRef] [PubMed]
37. Schisterman, E.F.; Perkins, N.J.; Liu, A.; Bondell, H. Optimal Cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology* **2005**, *16*, 73–81. [CrossRef]
38. Brooks, K.; Burns, G.; Spencer, T.E. Conceptus elongation in ruminants: Roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2014**, *5*, 53. [CrossRef]
39. Romero, J.J.; Antoniazzi, A.Q.; Nett, T.M.; Ashley, R.L.; Webb, B.T.; Smirnova, N.P.; Bott, R.C.; Bruemmer, J.E.; Bazer, F.W.; Anthony, R.V.; et al. Temporal Release, paracrine and endocrine actions of ovine conceptus-derived interferon-tau during early pregnancy. *Biol. Reprod.* **2015**, *93*, 146. [CrossRef]
40. Spencer, T.E.; Forde, N.; Lonergan, P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 5941–5950. [CrossRef]
41. Balhara, A.K.; Gupta, M.; Singh, S.; Mohanty, A.K.; Singh, I. Early pregnancy diagnosis in bovines: Current status and future directions. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 958540. [CrossRef] [PubMed]

42. Reese, S.T.; Pereira, M.C.; Vasconcelos, J.L.M.; Smith, M.F.; Green, J.A.; Geary, T.W.; Peres, R.F.G.; Perry, G.A.; Pohler, K.G. Markers of pregnancy: How early can we detect pregnancies in cattle using pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) and microRNAs? *Anim. Reprod.* **2016**, *13*, 200–208. [CrossRef]
43. Sasaki, K.; Yamagishi, N.; Kizaki, K.; Devkota, B.; Hashizume, K. Microarray-based gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in dairy cows with experimental hypocalcemia and milk fever. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 247–258. [CrossRef] [PubMed]
44. Kizaki, K.; Kageyama, T.; Toji, N.; Koshi, K.; Sasaki, K.; Yamagishi, N.; Ishiguro-Oonuma, T.; Takahashi, T.; Hashizume, K. Gene expression profiles in bovine granulocytes reflect the aberration of liver functions. *Anim. Sci. J.* **2020**, *91*, e13324. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.