

MAJALAH



**KUMPULAN ALIH BAHASA DI
BIDANG PETERNAKAN DAN
KESEHATAN HEWAN**

TAHUN 2018

PROLIFERASI SEL STEROIDOGENIK LUTEAL PADA SAPI

Shin Yoshioka¹, Hironori Abe², Ryosuke Sakumoto³, Kiyoshi Okuda^{1,2} *

¹ Sekolah Tinggi Ilmu Pengetahuan Alam dan Teknologi, Universitas Okayama, Okayama, Jepang,

² Sekolah Pascasarjana Ilmu Lingkungan dan Kehidupan, Universitas Okayama, Okayama, Jepang,

³ Unit Penelitian Biologi Reproduksi, Institut Nasional Ilmu Agrobiologi, Tsukuba, Jepang

Abstrak

Pertumbuhan dari korpus luteum (CL) yang cepat setelah ovulasi diyakini terutama disebabkan oleh peningkatan ukuran sel luteal (hipertrofi) dan bukan akibat peningkatan jumlahnya. Namun, hubungan antara pertumbuhan luteal dan proliferasi *Luteal Steroidogenic Cells* (LSCs) belum sepenuhnya dipahami. Salah satu tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah LSC mengalami proliferasi selama pertumbuhan CL. Tujuan kedua adalah untuk mengetahui apakah luteinizing hormon (LH), yang diketahui memiliki peran dalam proliferasi dan diferensiasi sel folikel, juga mempengaruhi proliferasi LSC. Ki-67 (sebuah marker proliferasi sel) diekspresikan pada tahap awal, perkembangan dan pertengahan luteal dan beberapa sel positif Ki-67 mengekspresikan HSD3B (marker steroidogenic). Kandungan DNA pada LSC yang diisolasi dari CL yang sedang berkembang meningkat jauh lebih cepat (mengindikasikan pertumbuhan yang cepat) daripada kandungan DNA LSC yang diisolasi dari CL pertengahan. Siklus sel-gen progresif CCND2 (cyclin D2) dan CCNE1 (cyclin E1) mRNA dinyatakan lebih kuat pada sel luteal kecil dibandingkan pada sel luteal besar. LH meregulasi laju peningkatan DNA pada LSC yang diisolasi dari fase luteal pertengahan namun tidak pada LSCs dari tahap pengembangan. LH menekan ekspresi CCND2 di LSCs dari fase luteal pertengahan namun tidak dari fase luteal yang berkembang. Selanjutnya, ekspresi mRNA reseptor LH (LHCGR) lebih tinggi pada stadium luteal pertengahan daripada pada stadium luteal yang sedang berkembang. Hasil keseluruhan menunjukkan bahwa pertumbuhan CL sapi tidak hanya disebabkan oleh hipertrofi LSC tetapi juga akibat peningkatan jumlah sel, dan diketahui bahwa kemampuan proliferasi sel steroidogenik luteal menurun antara tahap perkembangan dan pertengahan fase luteal.

Pendahuluan

Korpus luteum (CL) adalah kelenjar endokrin sementara, yang terbentuk dari pecahnya folikel setelah ovulasi. CL menghasilkan progesteron (P4), yang diperlukan untuk pembentukan dan pemeliharaan kebuntingan pada mamalia [1,2]. CL adalah salah satu jaringan yang tumbuh paling cepat pada mamalia betina dewasa [3,4]. Selama 10 hari pertama dari 21 hari siklus estrus pada sapi, berat luteal meningkat antara 20 sampai 30 kali lipat [4]. CL mencapai kematangan struktural dan fungsional pada fase luteal pertengahan (hari ke 10) dan kemudian mengalami regresi pada akhir siklus estrus [5,6].

Penyusun utama CL adalah (1) sel luteal besar yang diduga berasal dari granular granulosa sel, (2) sel luteal kecil yang diduga berasal dari sel-sel teka folikuler dan (3) sel non-steroidogenik seperti sel endotel, fibroblas dan sel imun [7-10]. Vaskularisasi menjadi sangat penting sebagai bentuk CL, dan vaskularisasi tersebut disertai oleh proliferasi sel luteal endotel yang cepat [11-13]. Selama pertumbuhan CL, *steroidogenic luteal cell* (LSCs) mengalami perubahan dinamis [4,6], namun tidak ada bukti jelas bahwa mereka mengalami proliferasi.

Salah satu pendekatan untuk menentukan apakah LSCs berproliferasi adalah dengan melakukan uji pada gen yang mengatur proliferasi sel (*cell cycle-related gene*) dan diferensiasi

sel. Regulasi proliferasi dan diferensiasi sel sangat penting untuk organogenesis normal dalam mendapatkan ukuran, morfologi dan fungsi yang tepat [14]. Untuk homeostasis jaringan, diferensiasi biasanya dikoordinasikan dengan keluar dari siklus sel [15]. Siklus sel diatur oleh *cyclin-dependent kinases* (CDK) dan beberapa protein yang merangsang atau menghambat aktivitasnya [16]. Progresi melalui fase G1 dikendalikan terutama oleh CDK4 / 6 dan CDK2 yang masing-masing berasosiasi dengan CCND (siklin D) dan CCNE (siklin E). Masuknya sel ke fase-S melibatkan kerjasama siklin CDK4/6 dan tipe D dengan kompleks CCNE-CDK2 [17,18]. Berbeda dengan siklin, penghambat CDK seperti CDKN1A (p21Cip1) dan CDKN1B (p27Kip1) adalah regulator negatif yang menahan siklus sel dengan mengikat dan menghambat aktivitas kompleks cyclin-CDK [19]. Namun, tidak diketahui sejauh mana gen yang mengatur proliferasi sel terlibat dalam mengendalikan pertumbuhan luteal.

Luteinizing hormone (LH) mengatur berbagai fungsi ovarium. Aktivasi reseptor LH (LHCGR) pada sel folikel oleh LH surge preovulasi, menyebabkan ovulasi dan dengan cepat memulai program diferensiasi terminal sel granulosa dalam proses yang disebut luteinisasi [20]. Penghentian proliferasi sel selama luteinisasi dikaitkan dengan penurunan progresif regulator siklus sel positif dan dengan meningkatnya ekspresi penghambat CDK CDKN1A dan CDKN1B [21,22]. LH juga mengatur penurunan mRNA CCND2 dan protein serta menginduksi penghambat CDK pada sel granulosa tikus [23]. Dengan demikian, LH memainkan peran penting dalam proliferasi dan diferensiasi sel folikel. Namun, peran LH dalam proliferasi LSC belum diketahui secara pasti.

Untuk mengetahui apakah LSC mengalami proliferasi selama pertumbuhan CL, kami mengeksplorasi 1) ekspresi KI-67, marker proliferasi sel, dan HSD3B (juga dikenal sebagai 3 β -HSD), yang merupakan marker spesifik untuk sel steroidogenik, pada jaringan luteal sapi, 2) ekspresi gen terkait siklus sel dan PTEN (fosfatase dan tensin homolog; pengatur utama proliferasi sel) pada LSC yang baru saja diisolasi dan 3) proliferasi kultur sel LSC yang diisolasi dari CL yang sedang berkembang dan fase pertengahan. Untuk menentukan jenis sel LSC yang berproliferasi, kita membandingkan gen terkait siklus sel dan tingkat PTEN mRNA antara sel luteal besar dan kecil. Kami juga memeriksa efek LH terhadap kultur LSC dan ekspresi gennya terkait siklus sel.

Materi dan Metode

Pernyataan Etik

Dalam penelitian ini, kami tidak melakukan percobaan pada hewan hidup. Ovarium dikumpulkan dari sapi Holstein yang tidak bunting di tempat pemotongan hewan lokal (Tsuyama Meat Center) sesuai dengan protokol yang disetujui oleh *institutional animal care* setempat. Semua sampel dan data yang dianalisis dalam penelitian ini diperoleh dengan izin dari pusat di atas.

Koleksi CL

Tahap siklus estrus diidentifikasi dengan pengamatan makroskopis ovarium dan uterus seperti yang dijelaskan sebelumnya [24]. Jaringan CL dikumpulkan dari sapi pada lima tahap siklus estrus yang berbeda (awal: Hari 2-3; perkembangan: Hari ke 5-7; pertengahan: Hari 9-12; akhir: Hari 15-17; tahap regresi luteal: Hari 19 - 21). Untuk percobaan kultur sel, ovarium dengan CL direndam dalam NaCl fisiologis dingin dan diangkut ke laboratorium.

Untuk uji imunohistokimia, jaringan CL segera dipisahkan dari ovarium dan dibedah, dipisahkan dari jaringan ikat. Sampel jaringan difiksasi pada 10%(v/v) buffer formalin fosfat netral (pH 7,0) selama 24 jam pada suhu kamar dan kemudian dimasukkan ke dalam lilin

parafin. Sampel dipotong menjadi 4 µm dan dipasang pada slide silanisasi mikroskop kaca (Dako).

Isolasi sel

Jaringan luteal dipisahkan secara enzimatik dan sel luteal dikultur seperti yang dijelaskan sebelumnya [25]. Sel luteal disuspensikan dalam medium kultur, DMEM, dan medium F-12 Ham [1:1 (vol/vol); Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO; no.D8900] mengandung calf serum 5% (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, no 16170-078) dan gentamisin 20 µg / ml (Teknologi Hidup, nomor 15750-060). Viabilitas sel lebih besar dari 85% seperti yang dinilai oleh trypan blue exclusion. Sel-sel dalam suspensi sel terdiri dari sekitar 75% sel luteal kecil, 20% sel luteal besar, sel endotel 5% atau fibrosit, dan tidak ada eritrosit. Beberapa LSC yang baru saja diisolasi dicuci dengan PBS (-) kemudian digunakan untuk analisis gen. Sel luteal kecil dan besar dikumpulkan secara terpisah dari LSC yang baru saja diisolasi di bawah mikroskop. Sekitar 300 sel dikumpulkan untuk setiap jenis sel. Ukuran sel diukur dengan okular dan *stage mikrometer*. Sel luteal kecil dan besar diidentifikasi berdasarkan ukurannya: <20 µm dan > 35 µm.

Untuk mengkonfirmasi identitas sel luteal kecil dan besar, kami menentukan tingkat ekspresi oksitosin mRNA, yang sangat diekspresikan pada sel luteal besar, dan mRNA LHCGR, yang sangat diekspresikan pada sel luteal kecil. Ekspresi seperti inilah yang diharapkan.

Kultur Sel

Sel luteal yang terdispersi dibiakkan pada $0,5 \times 10^5$ sel hidup per ml dalam piring klaster 4-sumuran (Nunc, Roskilde, Denmark, No. 176740) untuk uji proliferasi sel atau 2×10^5 sel hidup per ml dalam cluster dishes 24-sumuran (Coster, Cambridge, USA; no.3524) untuk analisis gen. Mereka kemudian dikultur dalam atmosfer yang lembab 5% CO₂ di udara pada suhu 37,5°C dalam inkubator N₂-O₂-CO₂ (ESPEC Corp., Osaka, Jepang;BNP-110). Setelah 16 jam kultur, medium tersebut diganti DMEM / F-12 yang mengandung serum betis 5% (untuk uji proliferasi sel) atau DMEM/F-12 yang mengandung 0,1% [b/v] BSA, 5 ng/ml sodium selenite, 5 Mg ml *transferring* dan 2 µg/ml insulin (untuk analisis gen) dengan atau tanpa LH (10 ng / ml).

Imunohistokimia dan imunofluoresens

Ekspresi KI-67 yang merupakan marker proliferasi sel dalam CL sapi ditunjukkan oleh imunohistokimia. Bagian yang telah dipotong sebesar 4 µm, dibersihkan dari paraffin dengan cara direhidrasi dalam etanol bertingkat, dan dicuci dengan air mengalir. Retrieval antigen dilakukan dengan menempatkan slide dalam buffer mendidih (0,01 M sitrat asam, pH 6) selama 15 menit. Aktivitas peroksidase endogen dipadamkan dalam metanol dengan 0,3% H₂O₂ selama 10 menit. Pengikatan nonspesifik diblokir pada suhu kamar selama 1 jam dalam PBS yang mengandung .5% susu skim. Potongan tersebut kemudian diinkubasi dengan antibodi KI-67 anti-mouse (1: 200, Dako; M7240) semalam, pada suhu 4 C. Setelah inkubasi, bagian-bagian tersebut dicuci dengan PBS dan diinkubasi dengan pereaksi ImmPRESS UNIVERSAL (Laboratorium Vektor; MP-7500) selama 30 menit sesuai instruksi pabrik. Bagian divisualisasikan dengan 0,05% 3,3 – diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) pada 0,01 M PBS (pH 7,4) yang mengandung 0,01% H₂O₂.

Co-ekspresi KI-67 dan HSD3B akan terdeteksi oleh imunofluoresensi. Bagian-bagiannya sudah dicairkan, direhidrasi dalam etanol bergradasi bergradasi dan dicuci dengan air keran. *Retrieval antigen* dilakukan dengan menempatkan slide dalam buffer mendidih (0,01 M sitrat asam, pH 6) selama 15 menit. Pengikatan nonspesifik diblokir pada suhu kamar selama 1 jam pada susu skim PBS-5%. Potongan diinkubasi dengan *anti-mouse*

KI-67 (dijelaskan di atas) dan HSD3B anti-goat (1: 100, Santa Cruz; sc-30820) semalam pada suhu 4 C. Setelah diinkubasi, bagian tersebut dicuci dengan PBS tiga kali diikuti oleh Inkubasi 1 jam dengan antibodi sekunder yang tepat diencerkan pada 1: 1000 (antimouse atau IgG kambing yang terkonjugasi dengan Alexa 488 atau 594) pada suhu kamar dalam kegelapan. Coverslips dipasang pada slide dengan pereaksi antifade ProLong Gold dengan DAPI (Invitrogen; P36935).

Uji proliferasi sel

Proliferasi sel Bovine pada fase perkembangan mid sel luteal, ditunjukkan dengan metode spektrofotometri Labarca dan Paigen [26]. Sel steroidogenik baskular sapi, diisolasi dari tahap perkembangan dan stadium pertengahan (*mid stadium*), kemudian dikultur selama 1, 4, 7 dan 10 hari, dan kandungan DNA diukur pada akhir kultur.

Isolasi RNA dan sintesis cDNA

RNA Total dibuat dari CL sapi sepanjang siklus estrus dan LSCs diisolasi menggunakan reagen TRIZOL sesuai dengan petunjuk pabrik pembuatnya (Invitrogen, Carlsbad, CA, nomor 15596-026). Sejumlah kecil RNA total dibuat dari sel luteal kecil dan sel luteal besar yang dikumpulkan secara terpisah menggunakan kit skala mikro RNA PureLink (Invitrogen, no 12183016) sesuai petunjuk pabriknya. RNA total ditranskripsi ulang menggunakan sistem ThermoScript RT-PCR (Invitrogen, no 11146-016).

Tabel 1. Penggunaan Primer pada kuantitatif RT- PCR

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Accession no.	Product (bp)
CCND2	Forward	TTCAGCAGGATGAGGATGTG	NM001076372	146
	Reverse	ACGGTACTGCTGCAGGCTAT		
CCNE1	Forward	TTCCTGCTGAAGATGCACAC	NM001192776	78
	Reverse	CTTCTTTTGCTTGGGCTTTG		
CDKN1A	Forward	AGCATCCTTTGCTTTCCTCA	NM001098598	72
	Reverse	AGAGAGTGCCACCCAGAGAA		
CDKN1B	Forward	AGATGTCAAACGTGCGAGTG	NM001100346	104
	Reverse	GCCAAAGAGGTTTCTGCAAG		
PTEN	Forward	TGACTGCTCCATCTCCTGTG	XM002698370	119
	Reverse	CCACAGCAGGTACACGATTG		
LIHCGR	Forward	CTAGCCATCACGGGAAATGT	U20504	102
	Reverse	GTCTGCAAAGGAGAGGTTGC		
Oxytocin	Forward	CTTCTCCCAGCACTGAGACC	M25648.1	103
	Reverse	CCGGCTTTATTTCAATTGTCA		

doi: 10.1371/journal.pone.0084186.t001

Real-time PCR

Eksresi gen diukur dengan PCR real-time menggunakan MyiQ (Bio-Rad, Tokyo, Jepang) dan iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad; No. 170-8880) yang dimulai dengan 1 ng RNA total transkripsi terbalik seperti yang dijelaskan sebelumnya [27]. Kurva standar sampel cDNA dihasilkan pengenceran serial (1: 2 sampai 1: 1000). Eksresi GAPDH digunakan sebagai kontrol internal. 20 bp primer dengan kandungan GC 50-60% disintesis (Tabel 1). Isi PCR dengan 95 C selama 15 menit, diikuti oleh 45 siklus 94 C selama 15 detik, 55 C selama 30 detik dan 72 C selama 30 detik. Penggunaan sistem PCR QuantaTect SYBR Green pada suhu tinggi menghasilkan kuantifikasi produk PCR yang handal dan sensitif dengan linieritas tinggi.

Tabel 2. Berat luteal, DNA dan Kandungan protein pada CL sapi selama siklus estrus

	Early	Developing	Mid	Late	Regressed
Wet tissue weight (g/CL)	0.86±0.15 ^a	2.29±0.20 ^b	3.57±0.20 ^c	4.25±0.88 ^c	0.84±0.06 ^a
DNA contents (mg/CL)	0.52±0.09 ^a	2.00±0.55 ^{bc}	2.21±0.18 ^c	2.88±0.32 ^c	1.10±0.27 ^b
(Index of hyperplasia)					
Protein contents (mg/CL)	55.5±28.4 ^a	246.7±50.9 ^b	396.8±13.2 ^c	468.1±70.5 ^c	71.3±7.2 ^a

doi: 10.1371/journal.pone.0081186.t002

Analisis statistik

Semua data eksperimen ditampilkan sebagai mean ± sem. Signifikansi statistik perbedaan dalam kandungan DNA dan protein sepanjang siklus estrus dan proliferasi sel sel luteal bovine dievaluasi dengan ANOVA diikuti oleh *Fisher Protected least significant difference procedure* (PLSD) sebagai uji perbandingan ganda.

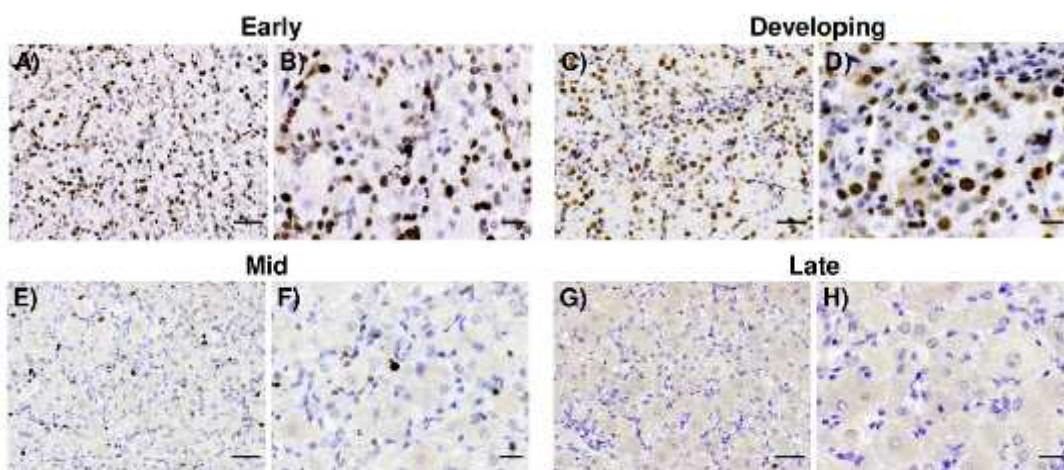
Hasil

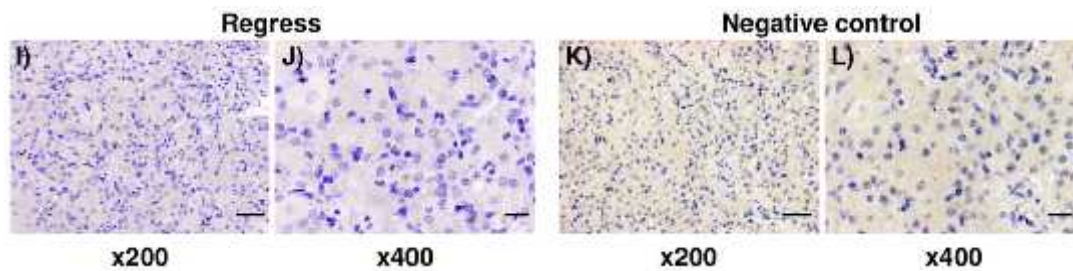
Berat luteal, kandungan DNA dan protein pada CL sapi sepanjang siklus estrus.

Berat dan kandungan protein CL (indeks ukuran sel) meningkat dari tahap awal sampai akhir dan kemudian menurun ke tahap luteal yang mengalami regresi, sedangkan kandungan DNA (indeks dari jumlah sel) hanya meningkat dari awal sampai tahap perkembangan folikel (Tabel 2).

Ekspresi KI-67 di CL selama siklus estrus

KI-67-sel positif dilokalisasi di CL sejak fase awal, perkembangan dan pertengahan luteal dan tingkat pewarnaan KI-67 lebih bagus pada CL awal dan yang berkembang daripada di Pertengahan CL (Gambar 1A-F). Sebaliknya, hanya sedikit sel KI-67-positif yang dilokalisasi pada akhir CL dan tidak ada aktivitas mitosis yang diamati pada CL yang regresi (Gambar 1G-J).





Gambar 1. Ekspresi KI-67 pada CL sapi. Gambaran representatif pewarnaan imunohistokimia untuk KI-67 pada CL sapi sepanjang siklus estrus (A,B: awal; C,D: perkembangan; E,F: pertengahan; G,H: akhir; I,J: regresi fase luteal). Skala bar menunjukkan 100 μm (magnitude rendah) dan 50 μm (magnitude tinggi).

Pewarnaan imunofluoresen ganda KI-67 dan HSD3B

Enzim steroidogenik HSD3B hadir pada jaringan CL pada fase awal, perkembangan dan pertengahan. Sekitar 2% dari sel yang positif KI-67 juga mengekspresikan HSD3B pada awal dan perkembangan CL (Gambar 2A, B, D) dan kurang dari 1% sel mengekspresikan kedua marker pada pertengahan fase CL (Gambar 2C, D).

Ekspresi gen yang terkait dengan siklus sel dan PTEN pada sapi LSCs

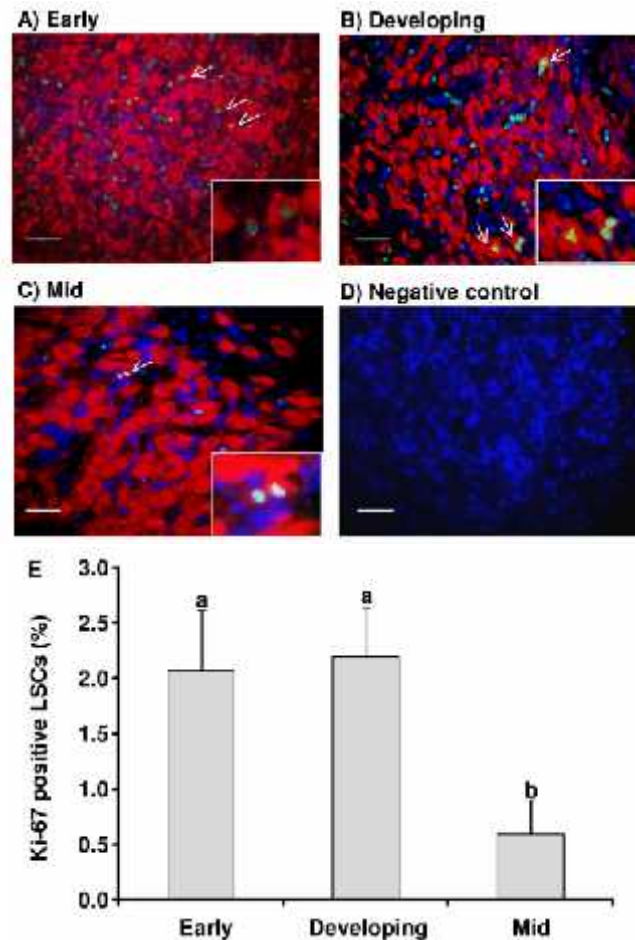
mRNA CCND2 dan CCNE1 yang baru terisolasi diekspresikan lebih kuat pada LSC dari CL pada masa perkembangan daripada LSC dari CL pertengahan. Di sisi lain, CDKN1A cenderung dinyatakan lebih kuat di LSC dari pertengahan CL daripada LSC dari perkembangan CL. Selanjutnya, ekspresi PTEN dinyatakan lebih kuat pada LSC dari pertengahan fase CL daripada LSC dari fase perkembangan CL (Gambar 3).

Ekspresi gen terkait siklus sel pada sel luteal kecil dan besar yang baru diisolasi dari sapi

Identitas sel luteal kecil dan besar, masing-masing dikonfirmasi oleh ekspresi mRNA oksitosin dan mRNA LHCGR (Gambar 4A). Siklus sel-gen progresif CCND2 dan CCNE1 mRNA diekspresikan lebih kuat pada sel luteal kecil dibandingkan pada sel luteal besar (Gambar 4B).

Proliferasi seluler dari kultur LSCs sapi

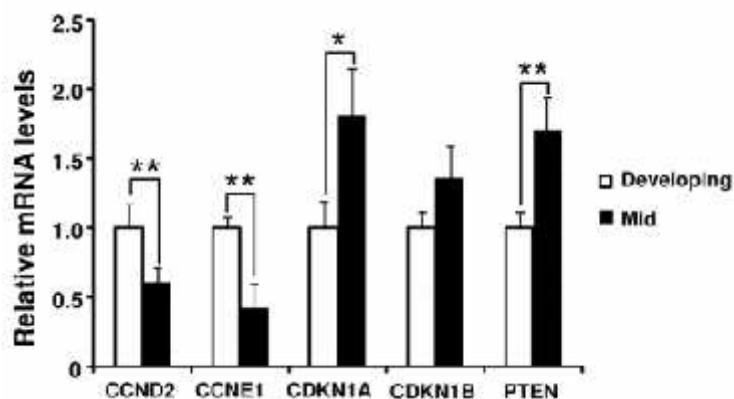
Kandungan DNA digunakan sebagai indeks proliferasi sel. Peningkatan linier kandungan DNA pada LSC yang dikultur diamati pada kontrol, dan sel yang ditreatmen dengan LH keduanya diisolasi dari fase perkembangan dan pertengahan luteal, meskipun kandungan DNA pada fase luteal pertengahan lebih kecil dari pada tahap perkembangan (Gambar 5A). LH menurunkan kandungan DNA pada LSC sapi yang diperoleh dari fase luteal pertengahan namun tidak dari fase perkembangan luteal (Gambar 5H, I). LSC meningkat setelah mereka dibiakkan (Gambar 5B-E). Lebih dari 95% sel positif *immunostained* dengan HSD3B (Gambar 5F).



Gambar 2. Ekspresi KI-67 dan HSD3B pada CL sapi. Gambaran representatif double-immunohistochemistry staining untuk KI-67 dan HSD 38 pada tahap awal (A), perkembangan (B) dan pertengahan (C) korpus luteum sapi. Serum kuda normal digunakan sebagai kontrol negatif (D). Skala bar menunjukkan 50 μm. (E) Presentase LSCs positif KI-67 pada CL sapi (mean±SEM, n=3 experiments). Presentase tiap fase luteal yang diturunkan dari terbaginya jumlah positif KI-67 dan HSD3B oleh jumlah sel positif HSD3B. Sel dihitung pada tiga area random yang terpilih. Perbedaan superskrip pada grafik mengindikasikan perbedaan yang signifikan ($P < 0,005$).

Efek LH pada gen terkait siklus sel dan PTEN pada LH LSC sapi

LH menurunkan level mRNA CCND2 pada LSC yang diisolasi dari fase pertengahan luteal, namun tidak pada LSC yang diisolasi dari fase luteal yang berkembang. LH tidak mempengaruhi gen LSC lain yang diekspresikan seperti CCNE1, CDKN1A, CDKN1B dan PTEN baik pada LSC berkembang atau pertengahan (Gambar 6).

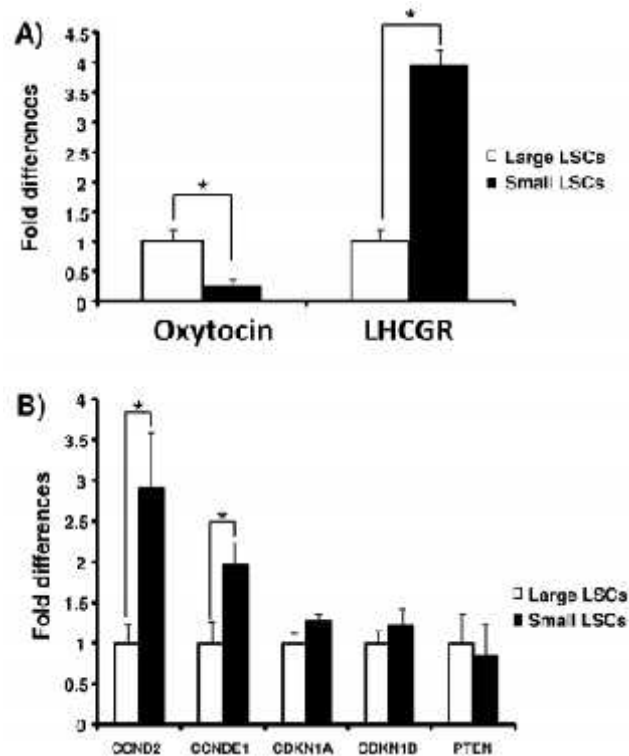


Gambar 3. Cell cycle-related genes ekspresi PTEN pada LSCs yang diisolasi pada saat masing-masing fase luteal sapi. Perbedaan berlipat dari Cell cycle-related genes seperti CCND2, CCNE1,

CDKN1A, CDKN1B dan suppressor gen tumor PTEN mRNA antaraisolat segar LSC pada fase perkembangan dan LSC fase pertengahan. Asterisk tunggal maupun ganda (*/**) mengindikasikan adanya perbedaan (*: $P < 0,1$, **: $P < 0,05$), yang ditentukan dengan ANOVA diikuti dengan Fisher's PLSD dan sebagai test perbandingan.

Ekspresi mRNA LHCGR di CL selama siklus estrus

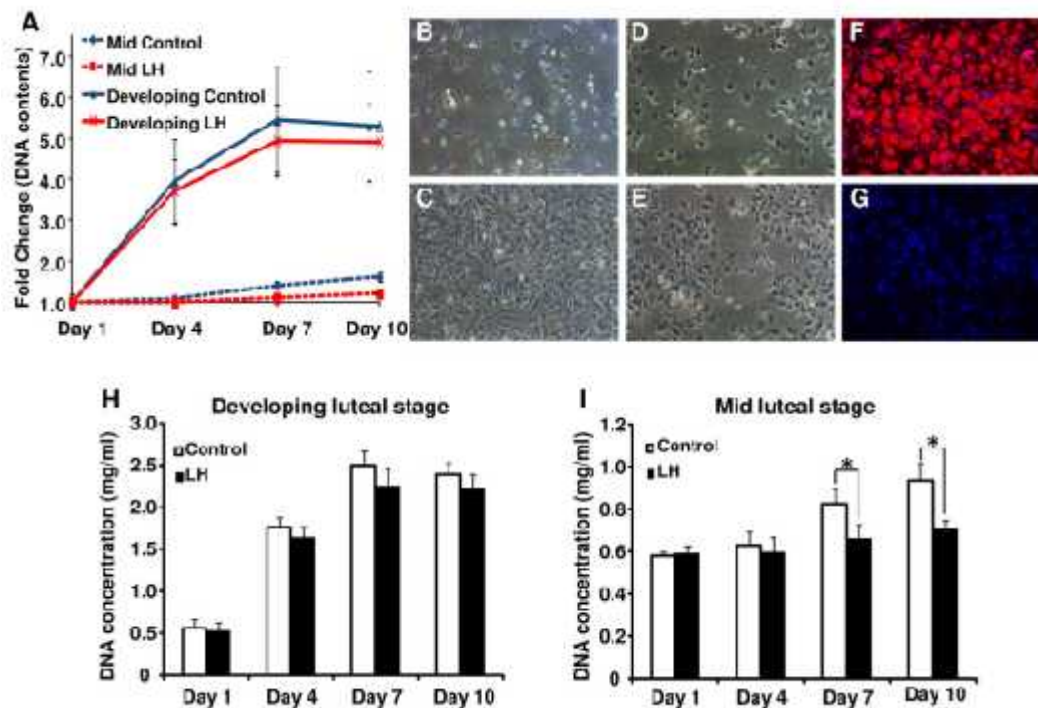
LHCGR mRNA diekspresikan dalam CL sapi selama siklus estrus, dan secara signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) pada fase luteal pertengahan daripada pada stadium luteal lainnya (Gambar 7).



Gambar 4. Cell cycle-related genes serta ekspresi PTN pada sel luteal kecil dan besar. Perbedaan berlipat oksitosin, LHCGR dan cell cycle-related genes seperti CCND2, CCNE1, CDKN1A, CDKN1B dan gen supresi tumor mRNA PTEN antar sel luteal kecil dan besar yang diisolasi dari fase perkembangan luteal dan fase pertengahan luteal. Asteriks (*) mengindikasikan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$), dianalisis dengan ANOVA, diikuti dengan PLSD Fisher perbandingan ganda.

Diskusi

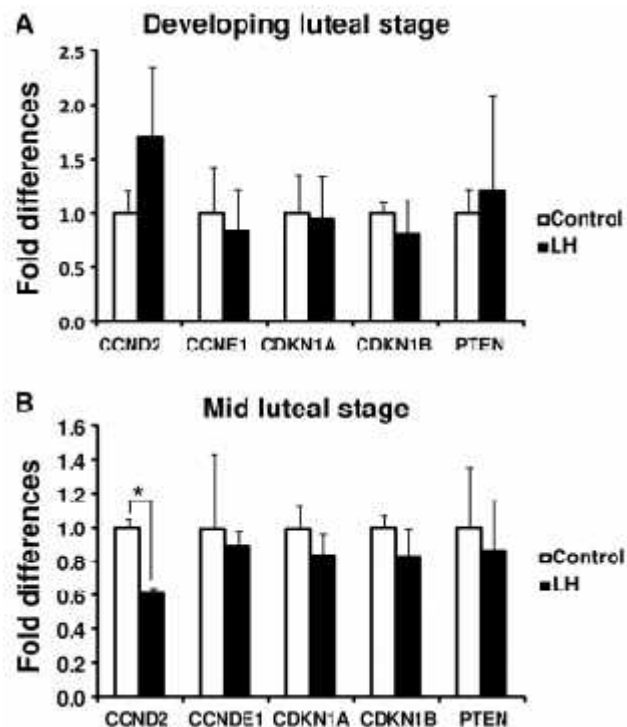
Ketika korpus luteum (CL) memiliki peran sentral dalam membangun dan mempertahankan kehamilan, mekanisme pertumbuhan CL tidak sepenuhnya dipahami. Meskipun sel positif untuk KI-67 (sebuah marker proliferasi sel) telah dilaporkan dalam CL yang berkembang [4,28,29], namun masih ada pendapat berlawanan dalam masalah ini karena kurangnya bukti [6]. Hasil saat ini dengan jelas menunjukkan bahwa LSCs sapi berproliferasi selama pertumbuhan CL. Pertama, kami mengamati sel-sel yang positif untuk kedua HSD3B, marker steroidogenik, dan KI-67 di fase awal, berkembang dan pertengahan CL (Gambar 2). Kedua, gen progresif siklus sel seperti CCND2 dan CCNE1 dinyatakan lebih kuat pada LSC yang diperoleh dari CL yang sedang berkembang dibandingkan LSC yang diperoleh dari CL pertengahan (Gambar 3). Ketiga, kultur BDCs sapi yang diisolasi dari CL sapi berproliferasi sampai mencapai pertemuan (Gambar 5).



Gambar 5. Proliferasi Kultur LSCs. (A) proliferasi seluler ditentukan oleh DNA di waktu tertentu, dengan atau tanpa disertai LH (10 ng/ml) setelah LSCs dibiakkan ($n=5$). (B) Observasi harian Luteal steroidogenic cell. (C) dan (D) Bentuk LSCs 4 hari dari fase CL yang berkembang. (E) Bentuk LSCs 4 hari dari pertengahan fase CL. Untuk mengkonfirmasi bahwa sel kultur benar-benar merupakan LSCs, LSCs diisolasi dari pertengahan fase luteal dan dikultur 24 jam, kemudian penecatan pewarnaan imunohistokimia dengan HSD3B dapat ditunjukkan (F). PBS digunakan pada kontrol negatif (G). (H) dan (I) secara berturut-turut menunjukkan efek LH (10 ng/ml) pada proliferasi seluler bovine luteal yang diisolasi dari fase perkembangan dan pertengahan CL (mean $\pm$ SEM, $n=5$ eksperimen). Asteriks (*) mengindikasikan bahwa LH memiliki efek yang signifikan pada konsentrasi DNA ($p < 0.05$), dengan analisis ANOVA yang diikuti dengan uji PLSD Fisher sebagai perbandingan ganda.

Untuk memastikan bahwa LSC berkembang biak selama pertumbuhan CL, kami pertama-tama menyelidiki kandungan DNA dan protein di jaringan luteal yang memberikan indeks pertumbuhan luteal yang baik, karena kandungan DNA dan proteinnya telah berkorelasi dengan berat luteal [4,29]. Meskipun kadar CL dan kandungan protein meningkat sampai fase luteal pertengahan, kandungan DNA berhenti meningkat pada tahap luteal yang berkembang (Tabel 2). *Double-immunostaining* untuk HSD3B dan Ki-67 memberikan bukti lebih langsung untuk berkembangbiakan LSC selama pertumbuhan CL. Sel *co-positif* HSD3B dan Ki-67 lebih banyak melimpah pada fase luteal yang sedang berkembang daripada pada fase luteal pertengahan (Gambar 2). Hasil ini konsisten dengan penelitian sebelumnya [4,28,29]. Terlebih lagi, gen progresif siklus sel seperti CCND2 dan CCNE1 mRNA dinyatakan lebih kuat pada LSC yang diambil dari CL pada tahap perkembangan (Gambar 3) dan LSC dari CL pada tahap perkembangan berkembang lebih cepat daripada yang berasal dari fase pertengahan CL (Gambar 5A). Pertumbuhan luteal Umumnya dianggap bergantung pada hipertrofi daripada hiperplasia [30-32]. Namun, hasil penelitian sebelumnya dan kali ini menunjukkan bahwa pertumbuhan luteal sapi disebabkan oleh peningkatan jumlah sel dan hipertrofi selama fase luteal awal dan perkembangan. Perbedaan utama antara sel luteal besar dan kecil pada CL sapi adalah diameternya [33-36]. Diameter terkecil sel luteal besar adalah 25 μm [37] dan diameter rata-rata sel luteal besar dan kecil masing-masing adalah 38,4 μm dan 17,2 μm [9]. Sel luteal besar dan sel luteal kecil diyakini berasal dari sel folikel granulosal dan sel folikel masing-masing [5,38].

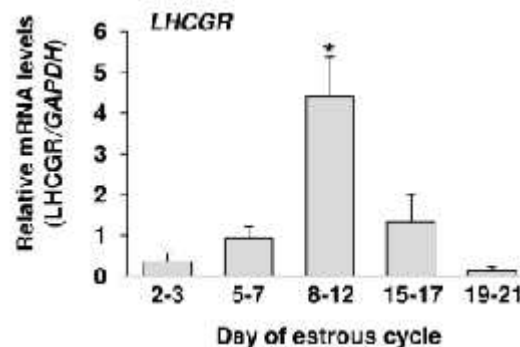
Telah dilaporkan bahwa siklus sel granulosa muncul setelah stimulus ovulasi pada mencit [23], tikus [39] dan kera rhesus [40]. Sel theca ditemukan berkembang biak lebih cepat daripada sel granulosa setelah luteinisasi diinduksi secara in vitro oleh *fetal bovine serum* 5% [41]. Karena ukuran sel steroidogenik KI-67-positif kurang dari 20 μm dalam penelitian ini, sehingga LSC yang berproliferasi sebagian besar tampaknya merupakan sel luteal kecil. Selanjutnya, gen progresif proliferasi sel diekspresikan lebih kuat pada sel luteal kecil dibandingkan pada sel luteal besar (Gambar 4). Dengan demikian, temuan ini juga mendukung gagasan bahwa hanya sel luteal kecil yang berkembang biak selama perkembangan luteal.



Gambar 6. Efek LH pada *cell cycle-related genes* dan ekspresi PTEN pada kultur LSCs. CCND2 < CCNE1, CDKN1A, CDKN 18 dan PTEN mRNA pada kultur LSCs diisolasi dari (A) fase perkembangan dan (B) pertengahan CL (mean $\pm$ SEM, n=4 eksperimen). Sel diekspose dengan LH (10 ng/ml) selama 24 jam. Asteriks (*) mengindikasikan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$), sebagai penentu digunakan ANOVA yang diikuti dengan uji PLSD Fisher dengan perbandingan ganda.

Perbedaan antara proliferasi sel luteal besar dan kecil menunjukkan bahwa mekanisme diferensiasi terminal berbeda antara kedua jenis sel ini. Berbeda dengan tahap luteal awal dan perkembangan, tahap luteal pertengahan ditandai oleh LSCs KI-67-positif yang relatif sedikit (Gambar 2) dan tingkat peningkatan kandungan DNA lebih lambat pada LSC yang diisolasi dari CL pada fase pertengahan daripada LSC yang diisolasi dari CL yang sedang berkembang (Gambar 5A). Selain itu, gen progresi siklus sel (CCND2 dan CCNE1) dinyatakan terekspresi lebih kuat pada fase luteal yang sedang berkembang daripada pada stadium luteal pertengahan (Gambar 3). Temuan ini menunjukkan bahwa diferensiasi terminal sel luteal sapi terjadi antara fase perkembangan dan pertengahan luteal. Kita ketahui bahwa LH menginduksi diferensiasi sel folikel proliferasi ke sel luteal non-proliferasi [21,22]. LH adalah salah satu substansi yang mengendalikan proliferasi seluler LSC. Dalam penelitian terkini, pemberian LH menurunkan proliferasi kultur LSC sapi yang diisolasi dari fase pertengahan CL, serta menurunkan tingkat CCND2 (Gambar 5I dan Gambar 6B). Hasil ini menunjukkan bahwa proliferasi seluler LSC turun berdasarkan LH. Selanjutnya,

ekspresi mRNA LHCGR lebih tinggi pada stadium luteal pertengahan daripada pada stadium luteal lainnya (Gambar 7). Berdasarkan temuan di atas, peningkatan LHCGR dan aktivasi oleh LH dapat menurunkan proliferasi seluler LSC dan membantu diferensiasi terminal LSC sapi. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memperjelas hubungan antara ekspresi reseptor LH dan proliferasi sel steroidogenik luteal.



Gambar 7.Ekspresi LHCGR pada CL bovine.Level relative mRNA LHCGR pada CL sapi sepanjang siklus estrus (n=4).Asteriks (*) mengindikasikan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$), yang ditentukan dengan ANOVA diikuti dengan test PLSD Fisher sebagai perbandingan ganda.

Jalur PI3K/AKT menginduksi proliferasi sel dengan memodulasi ekspresi gen terkait siklus sel [42] dan PTEN adalah regulator negatif jalur PI3K/AKT[43]. Dengan demikian, PTEN adalah salah satu pengatur utama proliferasi sel. Dari hasil penelitian kami didapatkan bahwa tingkat PTEN mRNA lebih tinggi pada LSC yang baru saja diisolasi dan diperoleh dari fase perkembangan CL dari pada fase luteal CL (Gambar 3) menunjukkan bahwa tingkat ekspresi PTEN berubah secara drastis antara fase perkembangan dan fase pertengahan luteal. Proliferasi seluler LSC diatur oleh LH, namun dalam penelitian ini LH tidak mempengaruhi ekspresi PTEN mRNA. Baru-baru ini, tingkat ekspresi PTEN telah terbukti dikontrol ketat oleh RNA aktif biologis seperti miR-106-25 microRNA [44]. Sebagai contoh, miR-25 sangat menurunkan ekspresi PTEN pada sel melanoma [45]. Selanjutnya, miR-25 dinyatakan lebih kuat pada stadium awal luteal CL daripada stadium akhir luteal CL pada domba [46]. Temuan ini menunjukkan bahwa miR-25 adalah salah satu kunci regulator PTEN. penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengklarifikasi mekanisme yang tepat yang mengatur ekspresi PTEN serta gen yang berhubungan dengan siklus sel pada CI sapi. Kesimpulannya, hasil penelitian kami menunjukkan bahwa pertumbuhan luteal tidak hanya bergantung pada hipertrofi LSC tetapi juga pada peningkatan jumlah sel luteal kecil, dan menunjukkan bahwa kemampuan proliferasi sel steroidogenik luteal berubah antara stadium perkembangan dan pertengahan luteal.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terima kasih kepada Dr. Albert F. Parlow dari Program Hormon dan Pituitari Nasional, Fakultas Kedokteran Universitas Maryland dan *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease(KIDDK)* untuk LH sapi (USDA-bLH-B6).

Referensi

1. Hansel W, Blair RM (1996) Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology* 45: 1267-1294.doi:10.1016/0093-691X(96)00098-2. PubMed: 16727883.
2. Meidan R, Milvae RA, Weiss S, Levy N, Friedman A (1999) Intraovarian regulation of luteolysis. *J Reprod Fertil Suppl* 54: 217-228.PubMed: 10692857.

3. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA (1994) Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog Growth Factor Res* 5: 159-175. doi:10.1016/0955-2235(94)90003-5. PubMed: 7919222.
4. Zheng J, Fricke PM, Reynolds LP, Redmer DA (1994) Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 51: 623-632. doi:10.1095/biolreprod51.4.623. PubMed: 7819442.
5. McClellan MC, Dieckman MA, Abel JH Jr., Niswender GD (1975) Luteinizing hormone, progesterone and the morphological development of normal and superovulated corpora lutea in sheep. *Cell Tissue Res* 164: 291-307. PubMed: 1201606.
6. Young FM, Rodger FE, Illingworth PJ, Fraser HM (2000) Cell proliferation and vascular morphology in the marmoset corpus luteum. *Hum Reprod* 15: 557-566. doi:10.1093/humrep/15.3.557. PubMed: 10686196.
7. Alila HW, Hansel W (1984) Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod* 31: 1015-1025. doi:10.1095/biolreprod31.5.1015. PubMed: 6394058.
8. Lei ZM, Chegini N, Rao CV (1991) Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol. Reprod* 44: 1148-1156. doi:10.1095/biolreprod44.6.1148. PubMed: 1873388.
9. O'Shea JD, Rodgers RJ, D'Occhio MJ (1989) Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *J Reprod Fertil* 85: 483-487. doi:10.1530/jrf.0.0850483. PubMed: 2703988.
10. Pate JL (1996) Intercellular communication in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 45: 1381-1397. doi:10.1016/0093-691X(96)00102-1. PubMed: 16727887.
11. Hazzard TM, Stouffer RL (2000) Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14: 883-900. doi:10.1053/beog.2000.0133. PubMed: 11141339.
12. Sugino N, Suzuki T, Sakata A, Miwa I, Asada H et al. (2005) Angiogenesis in the human corpus luteum: changes in expression of angiopoietins in the corpus luteum throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6141-6148. doi:10.1210/jc.2005-0643. PubMed: 16118339.
13. Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A et al. (1998) Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod* 13: 953-959. doi:10.1093/humrep/13.4.953. PubMed: 9619553.
14. Nakajima K, Inagawa M, Uchida C, Okada K, Tane S et al. (2011) Coordinated regulation of differentiation and proliferation of embryonic cardiomyocytes by a jumonji (Jarid2)-cyclin D1 pathway. *Development* 138: 1771-1782. doi:10.1242/dev.059295. PubMed: 21447557.
15. Jirawatnotai S, Moons DS, Stocco CO, Franks R, Hales DB et al. (2003) The cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 cooperate to restrict proliferative life span in differentiating ovarian cells. *J Biol Chem* 278: 17021-17027. doi:10.1074/jbc.M301206200. PubMed: 12609976.
16. Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-134. doi:10.1038/374131a0. PubMed: 7877684.
17. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512. doi:10.1101/gad.13.12.1501. PubMed: 10385618.
18. Stevaux O, Dyson NJ (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14: 684-691. doi:10.1016/S0955-0674(02)00388-5. PubMed: 12473340.
19. Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007) The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 28: 117-149. PubMed: 17077191.
20. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL (2002) Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol* 64: 69-92. doi:10.1146/annurev.physiol.64.081501.131029. PubMed: 11826264.
21. Hampl A, Pacherník J, Dvorák P (2000) Levels and interactions of p27, cyclin D3, and CDK4 during the formation and maintenance of the corpus luteum in mice. *Biol Reprod* 62: 1393-1401. doi:10.1095/biolreprod62.5.1393. PubMed: 10775192.

22. Robker RL, Richards JS (1998) Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol* 12: 924-940. doi:10.1210/me.12.7.924. PubMed: 9658398.
23. Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN (1998) Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol* 145: 47-54. doi:10.1016/S0303-7207(98)00168-3. PubMed: 9922098.
24. Miyamoto Y, Skarzynski DJ, Okuda K (2000) Is tumor necrosis factor alpha a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F(2alpha) release at luteolysis in cattle? *Biol Reprod* 62: 1109-1115. doi:10.1095/biolreprod62.5.1109. PubMed: 10775155.
25. Okuda K, Miyamoto A, Sauerwein H, Schweigert FJ, Schams D (1992) Evidence for oxytocin receptors in cultured bovine luteal cells. *Biol Reprod* 46: 1001-1006. doi:10.1095/biolreprod46.6.1001. PubMed: 1327197.
26. Labarca C, Paigen K (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102: 344-352. doi:10.1016/0003-2697(80)90165-7. PubMed: 6158890.
27. Sakumoto R, Komatsu T, Kasuya E, Saito T, Okuda K (2006) Expression of mRNAs for interleukin-4, interleukin-6 and their receptors in porcine corpus luteum during the estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol* 31: 246-257. doi:10.1016/j.domaniend.2005.11.001. PubMed: 16332426.
28. Al-zi'abi MO, Watson ED, Fraser HM (2003) Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction* 125: 259-270. doi:10.1530/rep.0.1250259. PubMed: 12578540.
29. Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP (1993) Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 133: 1871-1879. doi:10.1210/en.133.4.1871. PubMed: 8404629.
30. Baird D, T (1984) *The ovary*. New York: Cambridge University Press.
31. Meyer GT, Bruce NW (1979) The cellular pattern of corpus luteal growth during pregnancy in the rat. *Anat Rec* 193: 823-830. doi:10.1002/ar.1091930406. PubMed: 426308.
32. Tamura H, Greenwald GS (1987) Angiogenesis and its hormonal control in the corpus luteum of the pregnant rat. *Biol Reprod* 36: 1149-1154. doi:10.1095/biolreprod36.5.1149. PubMed: 2441768.
33. Alila HW, Dowd JP, Corradino RA, Harris WV, Hansel W (1988) Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. *J Reprod Fertil* 82: 645-655. doi:10.1530/jrf.0.0820645. PubMed: 3163003.
34. Fitz TA, Mayan MH, Sawyer HR, Niswender GD (1982) Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biol Reprod* 27: 703-711. doi:10.1095/biolreprod27.3.703. PubMed: 6291651.
35. Lemon M, Mauléon P (1982) Interaction between two luteal cell types from the corpus luteum of the sow in progesterone synthesis in vitro. *J Reprod Fertil* 64: 315-323. doi:10.1530/jrf.0.0640315. PubMed: 7069653.
36. O'Shea JD, Cran DG, Hay MF (1979) The small luteal cell of the sheep. *J Anat* 128: 239-251. PubMed: 438086.
37. Koos R, Hansel D, W (1981) *The large and small cells of the bovine corpus luteum: ultrastructural and functional differences*; NSM Hunzicker-Dunn. New York: Raven Press.
38. Moss S, Wrenn TR, Sykes JF (1954) Some histological and histochemical observations of the bovine ovary during the estrous cycle. *Anat Rec* 120: 409-433. doi:10.1002/ar.1091200205. PubMed: 13207782.
39. Cannon JD, Cherian-Shaw M, Chaffin CL (2005) Proliferation of rat granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology* 146: 414-422. PubMed: 15375025. Proliferation of Luteal Steroidogenic Cells
40. Chaffin CL, Brogan RS, Stouffer RL, VandeVoort CA (2003) Dynamics of Myc/Max/Mad expression during luteinization of primate granulosa cells in vitro: association with periovulatory proliferation. *Endocrinology* 144: 1249-1256. doi:10.1210/en.2002-220664. PubMed: 12639907.

41. Kayani AR, Glister C, Knight PG (2009) Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular-luteal transition in cattle. *Reproduction* 137: 67-78. PubMed: 18936084.
42. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C et al. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30:193-204. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007. PubMed: 15023437.
43. Phin S, Moore MW, Cotter PD (2013) Genomic Rearrangements of in Prostate Cancer. *Front Oncol* 3: 240. PubMed: 24062990.
44. Poliseno L, Salmena L, Riccardi L, Fornari A, Song MS et al. (2010) Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a protooncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal* 3: ra29. PubMed: 20388916.
45. Ciuffreda L, Di Sanza C, Cesta Incani U, Eramo A, Desideri M et al. (2012) The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade controls phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression through multiple mechanisms. *J Mol Med (Berl)* 90: 667-679. doi:10.1007/s00109-011-0844-1. PubMed: 22215152.
46. McBride D, Carré W, Sontakke SD, Hogg CO, Law A et al. (2012) Identification of miRNAs associated with the follicular-luteal transition in the ruminant ovary. *Reproduction* 144: 221-233. doi:10.1530/REP-12-0025. PubMed: 22653318.

DIAGNOSA AWAL KEBUNTINGAN PADA SAPI : STATUS MASA KINI DAN PERKEMBANGAN DI MASA DEPAN

**Ashok K. Balhara, Meenakshi Gupta, Surender Singh,
Ashok K.Mohanty dan Inderjeet Singh**

ABSTRAK

Diagnosa disfungsi atau kelainan reproduksi secara dini dan akurat sangat penting untuk pengelolaan reproduksi yang lebih baik pada hewan ternak. Efisiensi reproduksi yang tinggi, merupakan syarat awal untuk meningkatkan masa produksi seumur hidup (*life-time production*) sapi perah. Diagnosa awal kebuntingan, merupakan kunci utama untuk memperpendek calving interval dengan cara identifikasi lebih awal pada hewan yang berada masa kosong, melakukan terapi tepat waktu, sampai beranak kembali, sehingga dapat digunakan untuk mempertahankan masa kosong sapi mendekati 60 hari. Kerbau merupakan hewan perah yang sangat penting di subkontinen India dan diketahui memiliki masalah calving interval yang tinggi, usia pubertas terlambat, dan angka kejadian anestrus yang tinggi. Kurangnya metode deteksi awal kebuntingan yang akurat pada sapi, menyebabkan situasi tersebut lebih buruk. Beberapa metode deteksi kebuntingan dapat diterapkan pada sapi namun tidak ada yang memenuhi syarat sebagai metode diagnosis kebuntingan yang ideal karena keterbatasan sensitivitas, akurasi, spesifisitas, kecepatan, dan kemudahan dalam melakukan tes. Kemajuan teknik molekuler seperti proteomik dan aplikasinya dalam penelitian hewan telah memberi harapan baru untuk mencari molekul biomarker kebuntingan pada hewan-hewan ini. Tinjauan ini mencoba untuk menguji metode diagnosis kebuntingan umum yang tersedia untuk hewan perah, serta menilai kegunaan teknologi modern dalam mendeteksi penanda kebuntingan baru dan merancang strategi masa depan untuk penelitian di bidang ini.

1. Pendahuluan

Diagnosis kebuntingan awal dan tepat merupakan kriteria penting untuk pengelolaan reproduksi ternak yang lebih baik seperti pada sapi dan kerbau. Efisiensi reproduksi tinggi merupakan prasyarat untuk mewujudkan angka produksi seumur hidup (*life-time production*) yang tinggi dari hewan perah. Diagnosis kebuntingan dini sangat penting untuk memperpendek jarak kelahiran melalui peningkatan pengetahuan peternak untuk mengidentifikasi masa kosong hewan, sehingga dapat melakukan terapi dan mengawinkannya sesegera mungkin. Idealnya, masa kosong lamanya 60 hari pasca beranak, dan dianjurkan hewan perah untuk berkembang biak lagi. Peternak sapi perah perlu mengetahui sesegera mungkin jika tidak terjadi kebuntingan pada hewan setelah dikawinkan, sehingga dapat mengawinkannya kembali pada periode estrus selanjutnya. Perkembangan awal embrio pada sapi, berlangsung selama sekitar 42 hari postinseminasi [1], mencakup serangkaian kejadian yang dimulai dengan pembuahan dan yang berpuncak pada implantasi (Tabel 1). Setelah terjadinya implantasi, kematian embryo akibat penyebab noninfeksius jarang terjadi dan kebuntingan akan lebih terjaga [2,3]. Studi mengenai level progesteron, *pregnancy associated glycoprotein (PAGs)*, interferon τ , dan faktor awal kebuntingan (*early conception factor/ECF*) merupakan beberapa metode deteksi kebuntingan klinis yang diterapkan secara umum pada sapi, dan masing-masing memiliki manfaat dan keterbatasan tersendiri. Kerbau merupakan hewan perah yang penting di subkontinen India, namun hewan tersebut sering mengalami masalah reproduksi terutama calving interval yang tinggi, terlambat pubertas, dan tingginya kejadian anestrus. Kurangnya metode diagnosis kebuntingan dini yang akurat semakin memperparah keadaan tersebut.

Banyak metode diagnosis kebuntingan baik langsung maupun tidak langsung yang diterapkan pada bangsa sapi, namun hingga saat ini belum ada yang benar-benar memenuhi syarat sebagai metode diagnosis kebuntingan yang ideal karena keterbatasan yang mereka dapatkan. Kemajuan teknik molekuler seperti proteomik dan aplikasinya dalam penelitian hewan telah membuka peluang bagi komunitas riset untuk mencari molekul biomarker kebuntingan pada hewan-hewan ini. Pada tinjauan ini, kami menjelaskan mengenai metode diagnosa awal kebuntingan yang tersedia untuk hewan perah, menilai kegunaan teknologi modern dalam mendeteksi penanda kebuntingan baru dan merancang strategi masa depan untuk penelitian di bidang ini.

Tabel 1. Peristiwa penting selama periode awal embrio

Hari kebuntingan	Peristiwa
Hari 0-1	Fertilisasi, pelepasan sperma dan ovum menjadi satu sel embrio (zygot) di oviduk
Hari 2	Pembelahan awal pada oviduk (hingga tahap 8 sel), aktivasi genom embrio
Hari 3-4	Embryo memasuki uterus
Hari 5-6	16-32 sel zona tertutup embrio menjadi fase morula kompak
Hari 7-8	Formasi blastocoele dengan diferensiasi sel embrio
Hari 9-10	Ekspansi blastosit dan keluar dari zona pellucida
Hari 11-15	Elongasi blastosit dari struktur tubular menjadi filamentous
Hari 14-19	Pengenalan kebuntingan maternal
Hari 19-20	Implantasi mulai terjadi
Hari 21	Karunkula dan kotiledon mulai berkembang
Hari 22-41	Implantasi berkembang lebih lanjut
Hari 42	Implantasi telah sempurna

Dikutip dari Morris dan Diskin, 2008; Hafez, 1993

2. Metode Deteksi Kebuntingan

2.1 Metode Langsung

2.1.1. Palpasi Perrektal.

Cowie [5] pertama kali menggambarkan palpasi transrektal uterus sebagai metode untuk diagnosis kebuntingan pada sapi yang menjadikannya metode tertua dan paling banyak diterapkan untuk diagnosis kebuntingan dini pada hewan ternak besar bahkan sampai saat ini. Secara tradisional, untuk memastikan kebuntingan sekitar 30 hari kebuntingan dan seterusnya, para praktisi mengandalkan palpasi vesikel amnion [6] dan pergelinciran dari membran chorioallantoic antara ibu jari dan telunjuk [7]. Pada kerbau, palpasi per rektum juga dapat dijadikan metode sederhana, ekonomis, dan paling umum dipraktekkan untuk diagnosis kebuntingan. Namun, metode ini hanya akurat mulai dari hari ke 45 kebuntingan [8]. Meskipun palpasi per rektal adalah metode diagnosis kebuntingan yang paling murah, beberapa peneliti menyarankan bahwa pemeriksaan sapi bunting pada periode awal kebuntingan dengan palpasi transrektal dapat meningkatkan risiko kematian embrionik iatrogenik [9].

2.1.2. Ultrasonografi.

Dengan palpasi per-rektal, seorang ahli dapat secara akurat mendiagnosis hewan yang bunting mulai dari hari ke 35 kebuntingan, namun dalam penerapannya, sedangkan ultrasonografi telah memungkinkan diagnosis lebih dini pada hari ke 28 setelah inseminasi [9] atau lebih awal [10]. Dengan menggunakan USG, perubahan embrio mulai dapat teramati pada hari ke 21 setelah dikawinkan, detak jantung janin dapat divisualisasikan, dan dapat juga digunakan dalam membantu konfirmasi viabilitas kebuntingan [11]. Ultrasonografi transrektal memiliki keuntungan tambahan dalam memberikan informasi mengenai struktur ovarium, identifikasi kembar, dan penentuan kelayakan janin, usia, serta jenis kelamin [10, 12]. Ultrasonografi transrektal dapat digunakan dalam melakukan pemeriksaan menyeluruh terhadap kesehatan reproduksi hewan tersebut. Oleh karena itu, saat ini USG menjadi alat penelitian yang dapat diterapkan dengan baik untuk mempelajari biologi reproduksi sapi pada sapi [12] dan kerbau [10]. Keuntungan deteksi kebuntingan menggunakan USG ini adalah campur tangan pada alat reproduksi minimal, akurat serta efisien untuk diagnosis kebuntingan dini [13, 14] dan dapat meminimalkan kejadian abortus akibat palpasi.

Sebagian besar penelitian tentang fungsi ultrasonografi transrektal untuk diagnosa kebuntingan telah biasa diterapkan pada sapi, namun akhir-akhir ini mulai dikembangkan kegunaannya pada kerbau. Pada kerbau, ultrasonografi transrektal paling sering digunakan untuk menentukan kebuntingan, usia janin, dan jenis kelamin serta aktivitas ovarium [15]. Pada awal 1990an, berbagai pekerja mulai menggunakan ultrasonografi transrektal pada kerbau dengan visualisasi vesikel embrio dan embrio baik pada sapi maupun kerbau bunting antara 19 dan 22 hari setelah AI [16]. Dalam sebuah studi lapangan terhadap 260 kerbau antara 30 dan 45 hari setelah AI, dapat diamati bahwa sensitivitas deteksi kebuntingan dengan USG mencapai 97,9% [17]. Namun, dari hasil penelitian Pusat Penelitian Kaldera, Hisar, India yang tidak dipublikasikan, pemeriksaan USG kerbau bunting pada hari ke 21 setelah AI menunjukkan keakuratan sekitar 50%, dan meningkat hampir 100% pada hari ke 30. Temuan ini mendukung temuan lain pada sapi yang mengklaim bahwa ultrasonografi transrektal untuk diagnosis kebuntingan antara hari ke 21 dan 25 setelah perkawinan memiliki sensitivitas dan spesifisitas masing-masing 44,8% dan 82,3%, yang selanjutnya meningkat menjadi 97,7% dan 87,7%, bila dilakukan antara 26 dan 33 hari setelah AI [18]. Demikian pula, Nation et al. [19] menyampaikan bahwa sensitivitas dan spesifisitas diagnosis kebuntingan pada sapi perah laktasi berdasarkan deteksi ultrasonografi dari cairan rahim serta membran embrio mulai 28 sampai 35 hari setelah AI masing-masing 96% dan 97%. Pengamatan langsung janin dengan ultrasonografi ditemukan lebih akurat daripada tes untuk mengetahui protein spesifik kebuntingan dalam plasma, namun lebih banyak menghasilkan diagnosa negatif palsu [20].

Palpasi per-rektal dan ultrasonografi transrektal adalah metode langsung dan akurat untuk diagnosis kebuntingan. Keduanya membutuhkan banyak keterampilan dan pengalaman. Mesin ultrasonografi untuk veteriner dilengkapi dengan transduser rektum yang mahal terutama di negara-negara berkembang. Oleh karena itu, biaya awal yang tinggi dari teknologi ini membatasi penerapan dalam implementasinya [12].

2.2 Metode Tidak langsung

2.2.1 Progesteron.

Shemesh dkk. [21] mengusulkan bahwa perbedaan tingkat progesteron plasma perifer antara sapi bunting dan tidak bunting pada hari ke 19 setelah inseminasi dapat menjadi dasar untuk tes kebuntingan yang sangat awal. Laing and Heap [22] pertama kali mendokumentasikan progesteron dalam susu untuk mendiagnosis awal kebuntingan sapi. Pengukuran progesteron adalah metode tidak langsung untuk diagnosis kebuntingan pada banyak spesies ternak, Termasuk sapi, kerbau, domba, dan kambing.

Konsepsi memperpanjang usia korpus luteum (CL) dengan cara mencegah mekanisme luteolitik, sehingga memperpanjang dan mempertahankan karakter fungsionalnya, serta memastikan tingkat progesteron lanjutan yang tinggi [31]. Produksi progesteron ini mempertahankan endometrium uterus dalam keadaan yang mendukung perkembangan embrio, implantasi, dan perkembangan foetoplacental. Konsentrasi progesteron ini juga bervariasi setiap tahap siklus estrus, sehingga menjadikannya salah satu hormon reproduksi yang paling banyak dipelajari pada ruminansin sapi untuk deteksi kebuntingan dan aktivitas ovarium [32].

Studi pada siklus estrus sapi menunjukkan bahwa konsentrasi serum progesteron susu atau serum mencapai nilai maksimum pada 13-14 hari setelah estrus, dan jika hewan tersebut bunting, keadaan ini terus berlanjut hingga hari ke 21 setelah pembuahan [33] dan seterusnya. Progesteron berada pada konsentrasi yang tinggi dalam serum atau susu antara hari ke 18 dan 24 setelah inseminasi, dan menjadi dasar dalam mempertahankan kebuntingan pada sapi [34, 35]. Interferon- τ memberikan efek antiluteolitik dengan menghambat ekspresi endometrium reseptor oksitosin, dimana oksitosin ini menstimulasi pulsatile PGF2 α [36]. Meskipun konsentrasi progesteron yang rendah pada 18 sampai 24 hari setelah perkawinan secara akurat dapat memprediksi tidak terjadinya kebuntingan, namun konsentrasi progesteron tinggi selama periode ini juga bukanlah indikator kebuntingan yang spesifik karena akibat adanya variasi antara sapi dalam durasi dari siklus estrus serta kejadian kematian embrio dini atau akhir. Keuntungan uji progesteron untuk diagnosis kebuntingan diantaranya bersifat non invasive dalam koleksi sampel susu dan dapat digunakan untuk melakukan uji pada suatu farm, menggunakan alat uji progesteron susu sapi komersial (*cow-side milk progesterone tes kits*) [28, 37-39], meskipun sensitivitas alat uji ini dapat terganggu sampai batas tertentu. Tabel 2 mendiskripsikan hasil penelitian di beberapa laboratorium, pada tingkat progesteron pada sapi bunting dan tidak bunting.

Pada sapi kerbau, tingkat kandungan progesteron dalam susu mencapai empat sampai lima kali lebih tinggi daripada progesterone plasma darah [25, 26]. Sama seperti sapi kebuntingan kerbau juga dapat didiagnosis dengan tepat dengan penentuan konsentrasi progesteron plasma pada 21 hari post inseminasi [27].

Kendala utama dalam menggunakan uji progesteron untuk diagnosa kebuntingan adalah penggunaannya hanya pada kasus di mana tanggal perkawinan diketahui/dicatat dan tidak secara acak di gembalakan. Meskipun demikian, analisis progesteron tetap merupakan penggunaan klinis yang paling umum dari hormon reproduksi manapun.

Tabel 2. Level progesteron di beberapa tipe sampel pada Bovine

Bovine Spesies	Tipe sampel	Hari setelah inseminasi	Konsentrasi P4 (ng/mL)		Referensi
			Bunting	Tdk Bunting	
Sapi	Susu	(i) 0 atau 1,	1.5	1.2	Zaied et al., 1979 [23]
		(ii) 9 atau 10,	11.1	10.3	
		(iii) 21 atau 22,	12.0	3.0	
		(iv) 27 atau 28	12.5	6.8	
Sapi	Susu	18	>8	-	Simersky et al., 2007 [24]
Kerbau	Susu, Plasma	21-35	16.01 dan 3.61	0.41-2.67	Kamboj and Prakash, 1993 [25]
Kerbau	Plasma	0, 13	0.1 dan 3.6	0.6 (siklus hari ke 18)	Batra et al., 1979 [26]
Kerbau	Plasma	21 atau 22	1.0	<0.7	Perera et al., 1980 [27]
Sapi	Susu	20	>11	<0.8	Pennington et al., 1985 [28]
Kerbau	Susu	18-22	24.83	2.89	Singh and Puthiyandy, 1980 [29]
Sapi	Feses	18-24	>50 sebagai perbandingan tidak bunting	-	Isobe et al., 2005 [30]

2.2.2 Estronsulfat

Estron sulfat adalah produk steroid terkonjugasi dari estron, paling banyak terdapat pada placentom sapi betina [40] dan merupakan estrone utama yang terkandung dalam cairan janin (allantois dan amnion) dan plasma perifer induk sapi, yang jumlahnya dapat dideteksi pada hari ke 52 sampai akhir masa gestasi [41]. Konsentrasinya meningkat dari hari ke 60 dan mencapai puncak sekitar hari ke 150 setelah inseminasi [42]. Namun deteksi kebuntingan yang akurat hanya mungkin dilakukan setelah hari ke 100 kebuntingan, oleh karena itu tes ini hanya bisa mendeteksi kebuntingan yang telah lanjut [43]. Konsentrasi estrone sulfat dalam cairan tubuh induk merupakan indikator yang berguna untuk mempertahankan fungsi plasenta, terutama yang berkaitan dengan pertumbuhan embrio [44]. Pada sapi zebu, crossbred dan kerbau Murrah, Prakash dan Madan [45] melaporkan bahwa Level deteksi estron sulfat paling rendah adalah selama dua bulan pertama (<50 pg / mL), diikuti oleh kenaikan tajam pada bulan keempat dan nilainya stabil setelah mencapai Level tertinggi bulan keenam kebuntingan. Perbedaan level estron sulfat dalam cairan tubuh induk (pada plasma susu dan darah), dapat digunakan sebagai kriteria untuk mengkonfirmasi kebuntingan sapi setelah 110 hari inseminasi [46]. Konsentrasi Estrone sulfat juga sering dikaitkan dengan jumlah fetus [44], karena level estron sulfat tersebut akan lebih tinggi bila jumlah janin yang berkembang lebih dari satu. Namun, estrone sulfat bukanlah biomarker kebuntingan yang ideal, hal ini dikarenakan profil plasma dan susu dipengaruhi oleh banyak faktor lain seperti susunan genetik, berat badan, status paritas, dan lingkungan [46].

2.2.3 Konsepsi dan *Secret Produc* Plasenta.

Dapat diamati bahwa kebuntingan membawa banyak perubahan fisiologis pada tubuh wanita melalui sekresi/sekresi variasi biomolekul, yang berupa protein atau metabolit proteinnya. Hal ini mendukung banyak penelitian yang bertujuan untuk mengidentifikasi protein baru sebagai molekul kandidat untuk deteksi kebuntingan. Human chorionic gonadotropin (hCG), pertama kali ditemukan oleh Aschheim dan Zondek [47] dalam urin wanita bunting pada tahun 1927, dan

merupakan contoh hormon protein plasenta terbaik yang digunakan untuk diagnosis kebuntingan. Dengan kemajuan alat bioteknologi, diagnosis kebuntingan berbasis hCG telah menjadi tes yang paling sederhana, termurah, dan paling umum dilakukan manusia untuk mendiagnosis kebuntingan awal pada 8-10 hari setelah pembuahan [48]. Homolog dengan protein pada manusia, primata menghasilkan chorionic gonadotropin (CG) yang lebih tinggi untuk mempertahankan aktivitas luteal selama awal kebuntingan, sementara ruminansia menghasilkan interferon tipe I sebagai faktor antiluteolitik selama periode ini [49].

2.2.4 Early Conception Factor (ECF).

Early Pregnancy Factor (EPF, juga dikenal sebagai *Early Conception Factor* (ECF) merupakan suatu protein 10.84 kDa [50] yang hadir dalam serum betina mamalia bunting, terdeteksi dalam 6 sampai 24 jam setelah fertilisasi [51] dan menghilang dalam waktu 24 sampai 48 setelah kematian atau pemusnahan embrio [52]. EPF berada dalam serum hingga dua pertiga usia gestasi [53] serta menjadi tolak ukur serum paling awal jika terjadi fertilisasi dan konsepsi. Protein spesifik kebuntingan ini memiliki kemampuan immunosupresif tinggi yang dapat didemonstrasikan melalui *rosset inhibition* assay, dan uji tersebut pertama kali ditunjukkan pada tikus bunting [54]. Penelitian Laleh dkk. [55] menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dalam titer *rosset inhibition* pada sapi bunting dan sapi pada masa kosong, dengan nilai masing-masing 8-10 dan 3-5.

EPF dilaporkan terdapat dalam serum dari sebagian besar spesies mamalia bunting, termasuk manusia [56, 57], tikus [51], domba [58, 59], sapi [60-62], babi [63], kuda [64], dan beberapa binatang liar [65]. Chander [66] menyampaikan bahwa pada kerbau bunting, ada penurunan pembentukan *E-rosset* namun gagal menunjukkan adanya *rosset inhibition factor* (RIF, yang mungkin mengandung EPF) dalam serum. Antibodi sapi yang tinggi dalam melawan serum glikoprotein, digunakan untuk mendeteksi EPF [67] hal ini memprakarsai pengembangan metode uji laboratorium, yang telah dikomersialisasikan di AS sebagai uji *Early Conception Factor* (ECF) (Claimo Diagnostics®, Knoxville®, TN®) serta mengklaim dapat mendeteksi dalam 48 jam. Studi ekstensif mengenai efektivitas uji ECF komersial untuk mendiagnosis efektivitas, menunjukkan tingkat ketidakakuratan yang tinggi dari uji analisis ECF pada serum, dimana hanya 44,4% dan 55,6% sapi betina yang benar-benar teridentifikasi tidak bunting (masing-masing di hari ke 1 sampai 3 dan hari 7 sampai 9) setelah AI [61]; [60]; [62]. Meskipun EPF disekresikan pada awal kebuntingan, namun kebuntingan bukan merupakan faktor spesifik, melainkan dapat juga akibat sekresi dari sumber nonplasental seperti tumor dan *cell lines* yang berubah [50], yang menjadikan hasil metode uji kebuntingan tersebut keliru. EPF termasuk dalam famili *heat shock* protein, meskipun EPF terdeteksi secara ekstraselular, memiliki sifat faktor immunosupresif dan pertumbuhan [68]. Sifat-sifat tersebut sangat penting untuk menghindari penolakan terhadap antigen asing embrio dan mendukung perkembangannya. Oleh karena itu, dengan munculnya biosains modern, ada harapan bahwa perubahan ini dapat diidentifikasi dan digunakan sebagai alat diagnosa awal kebuntingan. Meskipun secara penerapannya kepraktisan tes awal semacam itu masih tetap rendah akibat tingginya tingkat kegagalan konsepsi selama 15 hari pertama kebuntingan [2].

2.2.5 Interferon- τ (IFN- τ).

Moor dan Rowson [69], seorang pelopor transfer embrio pada domba, melakukan transfer embrio umur 12, 13, dan 14 hari pada domba betina yang tidak kawin, hal tersebut menyebabkan interaksi antara embrio dengan rahim dan mempengaruhi fungsi luteal serta mengakibatkan terjadinya kebuntingan. Godkin dkk. [70] memurnikan *ovine trophoblastic protein-1* (oTP-1) yang merupakan protein sekretori awal blastosit domba dari hasil konsepsi kultur in vitro hari 14-16. Mereka mengungkapkan bahwa oTP1 bekerja pada endometrium induk, sehingga menimbulkan respons kontribusi dari induk untuk memelihara kebuntingan. Menurut Imakawa dkk. [49] urutan asam amino primer pada oTP-1 menunjukkan bahwa protein yang paling mungkin adalah interferon-alfa. Penelitian selanjutnya membuktikan bahwa sekresi dari konseptus pada kenyataannya bertanggung jawab dalam pengenalan induk terhadap adanya kebuntingan [71, 72].

Interferon- τ , sebuah interferon baru tipe I [73], pertama kali diproduksi saat konsepsi antara hari ke 12-13 setelah inseminasi pada domba dan hari 14-16 pada sapi [74-76]. Tingkat IFN- τ yang tinggi dapat dicapai pada hari ke 12-13 sebelum proses luteolisis dipicu [77]. Pada ruminansia, IFN- τ merupakan sebuah polipeptida asam amino 172 [73] yang memblokir transkripsi reseptor-reseptor alpha dan reseptor oksitosin estrogen di sel endometrium [78], menurunkan ekspresi enzim siklooksigenase-2 dan prostaglandin F-synthase [79], sehingga pelepasan PGF yang diperlukan untuk luteolisis dapat dicegah.

IFN- τ bekerja di dalam rongga uterus [80], namun tingkatnya sangat rendah pada jaringan ekstrauterine dan sirkulasi perifer, sehingga hal tersebut membatasi penggunaan IFN- τ secara langsung sebagai molekul yang digunakan untuk mendiagnosa kebuntingan dini [81]. Kemajuan teknik molekuler yang cepat dalam dua dekade terakhir telah membuka jalan baru untuk mengeksplorasi molekul unik ini sebagai marker kebuntingan pada ruminansia melalui penelitian tentang *IFN- τ stimulated genes* (ISG), yaitu protein stimulasi interferon 15 kDa (isg15), *myxovirus Resistance 2* (MX2), dan *2'-5' oligoadenylate synthetase* (OAS1), pada leukosit darah perifer selama kebuntingan awal [82, 83]. Analisis microarray secara lebih jauh menunjukkan bahwa banyak gen (termasuk IFN- τ yang distimulasi) diregulasi selama kebuntingan awal [84-86]. Green et al. [84] pernah menunjukkan bahwa ekspresi diferensial gen tersebut dipengaruhi oleh paritas hewan, dan lebih nyata terjadi pada heifer dibandingkan dengan hewan multipara. Semua hasil percobaan mengarahkan bahwa IFN- τ *stimulated genes* dapat dikembangkan menjadi biomarker deteksi kebuntingan yang potensial. Namun hingga saat ini, level uji lapangan masih belum ada yang sesuai dengan marker tersebut.

2.2.6 *Pregnancy Associated Glycoproteins (PAGs)*.

Relokasi lapisan sel trofoblastik embrionik tambahan ke endometrium pada spesies ruminansia [87] antara hari ke 20 sampai 28 dan sekresi dari konseptus mengarah pada keberhasilan implantasi dan kelanjutan kebuntingan [88]. *Pregnancy Associated Glycoproteins* (PAGs) adalah produk sekretori dari sel trofoblastik monoklonal dan binukleat di plasenta sapi [89]. Di antara glikoprotein ini, Butler dkk [90] mendeteksi adanya dua protein spesifik kebuntingan dalam serum sapi bunting (protein 65-70 kDa dan protein 47-53 kDa), masing-masing pada pI 4,6-4,8 dan 4,0-4,4. Dari protein tersebut, penyusun pertama menunjukkan reaksi kekebalan yang serupa dengan α 1-fetoprotein, dimana yang kedua tidak menunjukkan reaktivitas dengan protein yang diketahui, dan diberi nama "protein B" atau "pregnancy spesifik

protein B" (PSPB) di bovines. Pemurnian dan karakterisasi lebih lanjut beberapa isoform dari kotiledon fetus sapi menunjukkan bahwa protein B sebenarnya adalah 67 kDa PAG [91]. Investigasi biokimia dan fungsional menyebabkan protein ini menjadi enzim inaktif, anggotasuperfamili *asparticproteinase* yang memiliki homologi dengan pepsin, chymosin, cathepsins D, dan enzim renin [92, 93]. PAG merupakan kelompok protein yang sangat kompleks, sebuah fakta yang telah terbukti dan didokumentasikan di 22 perpustakaan cDNA [94]. Tiga jenis PAG yang paling banyak dipelajari yaitu PAGs PSPB, PAG 67 kDa atau bPAG-1 [93], dan PSP60 [95] adalah isomer protein yang sama yang memiliki urutan n-terminal serupa [96]. Transkripsi bPAG-2 dan -11 mRNA tampak selama kebuntingan; -4, -5, dan -9 mRNA pada awal kebuntingan dan bPAG-1 mRNA hanya dapat terdeteksi setelah hari ke 45 [97]. Menariknya, bovine PAG-4 dan bPAG-1 mRNA sangat ditranskripsikan sampai hari ke 250 kebuntingan namun menjadi tidak terlihat pada akhir kebuntingan [97]. Keenam sisi N-glikosilasi [98] berpengaruh terhadap variasi berat molekul dan *half life* PAGs [99] dan juga menjadi penyebab perbedaan ekspresi PAG selama tahap kebuntingan [97, 100].

Akhir-akhir ini, dapat diamati bahwa defek plasenta, lebih sering terlihat saat transfer somatik nuklear pada sapi, disertai dengan kadar PAG plasma yang tinggi, hal ini mungkin bertujuan untuk mengurangi pembersihan protein tersebut, disertai dengan perubahan pada struktur glikosilasi [94]. PSPB dapat dideteksi dalam serum sapi bunting selama masa kebuntingan, mulai sekitar minggu ke empat gestasi sampai beberapa minggu setelah parturisi [102]. Tingginya tingkat sirkulasi protein ini pada hari ke 80 sampai 100 postpartum, membatasi penggunaannya sebagai alat tes diagnosis kebuntingan, kecuali pada heifer [102, 103].

Sasser dkk. [104] mengembangkan radioimmunoassay dengan antibodi ganda dengan tujuan dapat mendeteksi PSPB secara serologis untuk mendeteksi kebuntingan pada sapi dan menemukan bahwa terjadi kenaikan serum secara progresif dari 1 ng/mL setelah hari ke 30 dan berturut-turut mencapai 9 ng/mL, 35 ng/mL, dan 150 ng/mL setelah tiga, enam, dan sembilan bulan kebuntingan. Penelitian ini menunjukkan bahwa deteksi PSPB lebih akurat daripada metode palpasi perrektal secara tradisional untuk deteksi kebuntingan. Green et al. [105] mengembangkan ELISA sandwich, menggunakan antibodi monoklonal anti-PAG, yang mampu mendeteksi PAG pada semua hewan bunting dengan konsentrasi 8,75 ng / mL pada hari ke 28, tertinggi pada 588,9 ng/ mL selama minggu kelahiran, dan terendah pada 4 minggu postpartum. Silva dkk. [106] memperkirakan akurasi 93,7; 95,4, dan 96,2% untuk inseminasi buatan postpartus pertama, kedua, dan ketiga yang sesuai dengan metode deteksi kebuntingan yang umum dipraktikkan. Sistem radioimmunoassay yang berbeda homolog (RIA-497) dan heterolog (RIA-706, RIA-780, RIA-809, dan RIA-Pool) dikembangkan untuk mengukur konsentrasi PAG darah ruminansia, memiliki korelasi tinggi dan dapat digunakan untuk deteksi kebuntingan 30-80 hari [107]. Radioimmunoassay dari serum bangsa zebu bunting menunjukkan konsentrasi PAG menjadi 6,0 ng/mL, 196,0 ng/mL, 1095,6 ng/mL, dan 348,4 ng/mL pada 8 minggu, pada 35 minggu, pada kondisi rata-rata, dan pada minggu ke 2 postpartum. Pola ini mirip dengan jenis ternak lainnya [108]. Berdasarkan hasil diagnosis kebuntingan PAG-RIA pada kerbau, telah mendorong tingkat akurasi diagnosis yang tinggi dan lebih awal pada hari ke-31 dengan sensitivitas 100% dan spesifisitas 90-100% [109]. PAGs digunakan untuk pengembangan metode deteksi kebuntingan tingkat atas [110], yang sekarang tersedia secara komersial dan dikenal

sebagai BioPRYN (BioTracking, Russia), DG29 (Genex Cooperative Inc., AS), dan IDEXX (IDEXX Laboratories, Inc., USA) . Tes darah BioPRYN adalah kit berbasis PAG yang paling banyak digunakan untuk deteksi kebuntingan pada ruminansia. Pada bulan Mei 2010, sudah ada 2 juta tes darah sapi yang dilakukan untuk deteksi kebuntingan (<http://biotrackingcom.siteprotect.net/about/timeline>).

3. Penelitian Terkini Biomarker Kebuntingan

Diperkirakan bahwa pemantauan perubahan sekuensial profil protein darah mulai saat estrus hingga berhasil terjadi konsepsi, serta melalui perkembangan gestasi dapat menyebabkan penemuan molekul baru dan spesifik untuk tahap fisiologis hewan. Agar memenuhi syarat sebagai penanda kebuntingan, molekul kandidat harus dapat secara akurat menentukan status kebuntingan sedini mungkin dengan kesalahan positif palsu atau negatif palsu minimal. Selain itu, penanda biologis untuk kebuntingan harus memiliki karakteristik sebagai berikut:

- i. secara spesifik regulasinya meningkat atau menurun selama kebuntingan,
- ii. sedikit dipengaruhi oleh faktor non-animal seperti pakan, lingkungan, dan interaksi obat-obatan,
- iii. memiliki kemampuan untuk mencerminkan usia dan kelangsungan konsepsi,
- iv. Berada dalam cairan tubuh yang mudah dijangkau seperti serum, susu, urine, dan leleran vagina,
- v. Tereksresi berlebih dalam waktu cukup lama untuk dijadikan sampel diagnosis.
- vi. Menunjukkan hasil yang cepat.

Proteomik diteliti dalam skala besar pada sisi fungsi, ekspresi, interaksi protein-protein, atau modifikasi posttranslasional pada sel, jaringan, atau organisme tertentu dan ditujukan untuk identifikasi semua protein yang ada [111]. Proteomik memberikan kesempatan untuk secara simultan menganalisis ribuan protein dalam satu percobaan dari campuran protein kompleks di berbagai cairan tubuh [112]. Hal tersebut akan membantu dalam mengidentifikasi biomarker spesifik dan sensitif yang memenuhi karakteristik keunikan molekul untuk diagnosis kebuntingan. Tujuan utama penelitian proteomik mencakup dokumentasi biomarker, mengubah pola ekspresi protein yang menunjukkan perubahan patofisiologis, dan secara terapi penting sebagai target obat [113]. Cairan tubuh yang mudah dijangkau seperti serum darah dan susu memiliki beragam protein melimpah dan beberapa protein ini menyusun sekitar 97% dari total serum dan proteom susu, dengan demikian mengganggu analisis proteomik (ditinjau oleh [113]). Sebaliknya, protein yang memiliki kelimpahan rendah, memiliki prospek tertinggi menjadi biomarker baru pada perubahan lingkungan internal tubuh. Untuk mengatasi masalah protein dengan kelimpahan tinggi tersebut, terdapat dua pendekatan yang disarankan, yaitu: penghilangan protein melimpah (biasanya oleh *immunoaffinity*) dan berfokus pada protein kelimpahan rendah/langka dengan penghilangan protein kelimpahan tinggi secara simultan, yang secara teknis dikenal sebagai *combinational protein ligand laboratory (CPLL)* [114]. Secara komersial tersedia Kit ProteoMiner yang berasal dari M/s Bio-Rad berbasis CPLL. Kedua pendekatan tersebut, bagaimanapun, menyebabkan hilangnya protein kelimpahan yang rendah secara signifikan di sepanjang protein kelimpahan yang tinggi, namun pendekatan yang kedua lebih disukai [114].

Informasi tentang proteom bovine dalam kaitannya dengan kebuntingan masih terbatas. Jin dkk. [115] melakukan analisis proteomik dengan menggunakan sampel serum darah sapi perah Holstein bunting dan tidak bunting pada usia 21 dan 35 hari setelah AI,

dan melaporkan bahwa profil gabungan protein utama yang terlibat dalam kebuntingan dini dan menyarankan potensi protein yang dapat diidentifikasi untuk mendeteksi kebuntingan dini pada bovine. Hal ini termasuk dalam sembilan titik spesifik kebuntingan pada sampel serum hari ke 21 dan hari ke 35. Protein spesifik kebuntingan diidentifikasi sebagai transferrin, albumin, daerah rantai berat IgG2a, dan daerah variabel rantai berat imunoglobulin gamma. Selanjutnya, analisis proteomik diferensial sampel susu dari sapi bunting dan tidak bunting menunjukkan 16 titik protein, 14 *pregnancy specific* dan 2 titik regulasi yang menurun dalam sampel susu hewanbunting [116]. *Pregnancy specific* proteinteridentifikasi sebagai prekursor albumin serum, daerah konstanta rantai berat IgG1, prekursor konglutinin, keratin epitelial 10, dan protein terkait ECH-kelchlike. Meskipun beberapa titik yang teridentifikasi adalah protein susu atau serum yang melimpah, berat molekuler dan nilai pI mereka berbeda dari susu utama atau protein serum. Hal ini menunjukkan bahwa protein ini dapat menjadi subunit kebuntingan atau fragmen albumin dan IgG tertentu atau membawa ekspresi protein kecil yang berbeda, sehinggamemunculkan potensi untuk mendeteksi kebuntingan.

Cukup menggembirakan, penelitian ini memerlukan penyelidikan lebih lanjut untuk menemukan metode deteksi kebuntingan. Studi pendahuluan pada sapi kerbau pada protein darah juga mendeteksi perubahan signifikan pada banyak protein dalam gel 2DE [117]. Protein penting yang ditemukan pada analisis MS adalah faktor Synaptojanin-1, apolipoprotein A-1, apolipoprotein B, Keratin 10, dan Von Willebrand, yang diketahui memiliki peran dalam embriogenesis dan masa kebuntingan awal.

Data yang dihasilkan dari analisis proteom sekuensial selama kebuntingan dapat diterapkan dalam beberapa jenis, misalnya, mempelajari kelayakan janin, kelainan genetik, dan sebagainya. Trisomypada Kebuntingan 21 hari, dapat dideteksi dengan sangat akurat dengan analisis proteomik serum maternal pada manusia [118]. Dengan tidak adanya satu indikator untuk proses kehidupan tertentu, kombinasi pola ekspresi lebih dari satu zat dapat digunakan untuk analisis tertentu seperti pada *quadruple test* di mana kadar empat konstituen darah (α fetoprotein, human chorionic gonadotropin, Oestriol tidak terkonjugasi, dan inhibin-A) telah digunakan untuk memprediksi probabilitas sindrom Down pada bayi [119]. Tes pendeteksian kebuntingan yang setara dengan *quadruple test* manusia dapat dicoba, di mana alternatif lain mempertimbangkan profil protein atau protein yang lebih banyak. Pendekatan ini juga akan memerlukan analisis menyeluruh melalui proteom bovine, sebelum tes tersebut tersedia bagi pemilik ternak dengan akurasi tinggi.

4. Kesimpulan

Diagnosa awal kebuntingan adalah aspek penting untuk mengoptimalkan produksi susu, namun metode tersebut saat ini belum memenuhi syarat sebagai diagnosis yang ideal karena keterbatasan keakuratan, tahap penerapan selanjutnya, dan membutuhkan instrumentasi yang rumit serta perlu penyiapan laboratorium. Hal ini menjamin akan adanya penelitian lebih lanjut mengenai pengembangan diagnosis awal kebuntingan untuk hewan ternak. Teknik instrumentasi dan proteomik terkini yang ada saat ini memberi harapan untuk penemuan molekul-molekul baru yang secara eksklusif terkait dengan perubahan metabolik maternal yang rumit, sehingga perlupenyelarasan dengan fisiologi perkembangan awal embrio dan pemberi sinyal pengenalan kebuntingan serta kelangsungan hidup kedepannya. Meskipun teknik ini masih dalam tahap awal penelitian ilmu hewan, namun molekul tersebut tetap menjanjikan sebagai terobosan yang telah lama ditunggu dalam perkembangan diagnosis kebuntingan pada ternak.

5. Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada National Fund for Basic, Strategic and Frontier Application Research in Agriculture (NFBSFARA), Indian Council of Agricultural Research, India, atas dukungan dananya.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] "Committee on Reproductive Nomenclature Recommendations for standardizing bovine reproductive terms," *The Cornell Veterinarian*, vol. 62, no. 2, pp. 216–237, 1972.
- [2] N. Ayalon, "A review of embryonic mortality in cattle," *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 54, no. 2, pp. 483–493, 1978.
- [3] D. Morris and M. Diskin, "Effect of progesterone on embryo survival," *Animal*, vol. 2, no. 8, pp. 1112–1119, 2008.
- [4] E. S. E. Hafez, *Reproduction in Farm Animals*, 6th edition, Lea and Febiger, Philadelphia, Pa, USA, 1993.
- [5] T. A. Cowie, *Pregnancy Diagnosis Tests: A Review*, Commonwealth Agricultural Bureaux Joint Publication no. 13, Commonwealth Agricultural Bureaux, Oxford, UK, 1948.
- [6] W. Wisnicky and L. E. Cassida, "A manual method for diagnosis of pregnancy in cattle," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 113, p. 451, 1948.
- [7] R. Zemjanis, *Diagnostic and Therapeutic Techniques in Animal Reproduction*, Williams and Wilkins, Baltimore, Md, USA, 2nd edition, 1970.
- [8] G. H. Arthur, D. E. Noakes, H. Pearson, and T. J. Parkinson, "Reproduction in the buffalo," in *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, WB Saunders, London, UK, 1966.
- [9] O. J. Franco, M. Drost, M.-J. Thatcher, V. M. Shille, and W. W. Thatcher, "Fetal survival in the cow after pregnancy diagnosis by palpation per rectum," *Theriogenology*, vol. 27, no. 4, pp. 631–644, 1987.
- [10] R. K. Sharma, J. K. Singh, S. K. Phulia, S. Khanna, and I. Singh, "Fetal sex determination with ultrasonography in buffaloes," *Indian Veterinary Journal*, vol. 88, no. 10, pp. 105–107, 2011.
- [11] S. Curran, R. A. Pierson, and O. J. Ginther, "Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 189, no. 10, pp. 1295–1302, 1986.
- [12] P. M. Fricke, "Scanning the future—ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle," *Journal of Dairy Science*, vol. 85, no. 8, pp. 1918–1926, 2002.
- [13] L. G. Paisley, W. D. Mickelsen, and O. L. Frost, "A survey of the incidence of prenatal mortality in cattle following pregnancy diagnosis by rectal palpation," *Theriogenology*, vol. 9, no. 6, pp. 481–491, 1978.
- [14] D. Vaillancourt, C. J. Bierschwal, D. Ogwu et al., "Correlation between pregnancy diagnosis by membranes and embryonic mortality," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 175, no. 5, pp. 466–468, 1979.
- [15] A. Ali and S. Fahmy, "Ultrasonographic fetometry and determination of fetal sex in buffaloes (*Bubalus bubalis*)," *Animal Reproduction Science*, vol. 106, no. 1-2, pp. 90–99, 2008.
- [16] C. H. Pawshe, K. B. C. Appa Rao, and S. M. Totey, "Ultrasonographic imaging to monitor early pregnancy and embryonic development in the buffalo (*Bubalus bubalis*)," *Theriogenology*, vol. 41, no. 3, pp. 697–709, 1994.
- [17] M. R. Bhosreker and I. M. Hangarge, "Ultrasonography for early pregnancy diagnosis in buffaloes," *Indian Journal of Animal Reproduction*, vol. 21, pp. 143–144, 2000.
- [18] M. C. Pieterse, O. Szenci, A. H. Willemse, C. S. A. Bajcsy, S. J. Dieleman, and M. A. M. Taverne, "Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test," *Theriogenology*, vol. 33, no. 3, pp. 697–707, 1990.

- [19] D. P. Nation, J. Malmo, G. M. Davis, and K. L. Macmillan, "Accuracy of bovine pregnancy detection using transrectal ultrasonography at 28 to 35 days after insemination," *Australian Veterinary Journal*, vol. 81, no. 1-2, pp. 63–65, 2003.
- [20] O. Szenci, J. F. Beckers, P. Humblot et al., "Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows," *Theriogenology*, vol. 50, no. 1, pp. 77–88, 1998.
- [21] M. Shemesh, N. Ayalon, and H. R. Lindner, "Early pregnancy diagnosis based upon plasma progesterone levels in the cow and ewe," *Journal of Animal Science*, vol. 36, no. 4, pp. 726–729, 1973.
- [22] J. A. Laing and R. B. Heap, "The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle," *British Veterinary Journal*, vol. 127, no. 8, pp. 19–22, 1971.
- [23] A. A. Zaied, C. J. Bierschwal, R. G. Elmore, R. S. Youngquist, A. J. Sharp, and H. A. Garverick, "Concentrations of progesterone in milk as a monitor of early pregnancy diagnosis in dairy cows," *Theriogenology*, vol. 12, no. 1, pp. 3–11, 1979.
- [24] R. Simersky, J. Swaczynova, D. A. Morris, M. Franek, and M. Strnad, "Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesterone in milk," *Veterinarni Medicina*, vol. 52, no. 1, pp. 19–28, 2007.
- [25] M. Kamboj and B. S. Prakash, "Relationship of progesterone in plasma and whole milk of buffaloes during cyclicity and early pregnancy," *Tropical Animal Health and Production*, vol. 25, no. 3, pp. 185–192, 1993.
- [26] S. K. Batra, R. C. Arora, N. K. Bachlaus, and R. S. Pandey, "Blood and milk progesterone in pregnant and nonpregnant buffalo," *Journal of Dairy Science*, vol. 62, no. 9, pp. 1390–1393, 1979.
- [27] B. M. Perera, N. Pathiraja, S. A. Abeywardena, M. X. Motha, and H. Abeygunawardena, "Early pregnancy diagnosis in buffaloes from plasma progesterone concentration," *Veterinary Record*, vol. 106, no. 5, pp. 104–106, 1980.
- [28] J. A. Pennington, L. H. Schultz, and W. F. Hoffman, "Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: field study in dairy cattle," *Journal of Dairy Science*, vol. 68, no. 10, pp. 2740–2745, 1985.
- [29] A. Singh and R. Puthiyandy, "Estimation of progesterone in buffalo milk and its application to pregnancy diagnosis," *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 59, no. 1, pp. 89–93, 1980.
- [30] N. Isobe, M. Akita, T. Nakao, H. Yamashiro, and H. Kubota, "Pregnancy diagnosis based on the fecal progesterone concentration in beef and dairy heifers and beef cows," *Animal Reproduction Science*, vol. 90, no. 3-4, pp. 211–218, 2005.
- [31] T. E. Spencer, N. H. Ing, T. L. Ott et al., "Intrauterine injection of ovine interferon- τ alters oestrogen receptor and oxytocin receptor expression in the endometrium of cyclic ewes," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 15, no. 2, pp. 203–220, 1995.
- [32] J. J. Kaneko, J. W. Harvey, and M. L. Bruss, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, 2008.
- [33] T. J. Parkinson, A. Turvey, and L. J. Jenner, "A morphometric analysis of the corpus luteum of the cow during the estrous cycle and early pregnancy," *Theriogenology*, vol. 41, no. 5, pp. 1115–1126, 1994.
- [34] R. G. Sasser and C. A. Ruder, "Detection of early pregnancy in domestic ruminants," *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, vol. 34, pp. 261–271, 1987.
- [35] M. Shemesh, N. Ayalon, and H. R. Lindner, "Early pregnancy diagnosis based upon plasma progesterone levels in the cow and ewe," *Journal of Animal Science*, vol. 36, no. 4, pp. 726–729, 1973.

- [36] E. Wolf, G. J. Arnold, S. Bauersachs et al., "Embryo-maternal communication in bovine—strategies for deciphering a complex cross-talk," *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 38, no. 4, pp. 276–289, 2003.
- [37] E. W. Gowan, R. J. Etches, C. Bryden, and G. J. King, "Factors affecting accuracy of pregnancy diagnosis in cattle," *Journal of Dairy Science*, vol. 65, no. 7, pp. 1294–1302, 1982.
- [38] R. L. Nebel, W. D. Whittier, B. G. Cassell, and J. H. Britt, "Comparison of on-farm laboratory milk progesterone assays for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy," *Journal of Dairy Science*, vol. 70, no. 7, pp. 1471–1476, 1987.
- [39] T. H. Wimpy, C. F. Chang, V. L. Estergreen, and J. K. Hillers, "Milk progesterone enzyme immunoassay: modifications and a field trial for pregnancy detection in dairy cows," *Journal of Dairy Science*, vol. 69, no. 4, pp. 1115–1121, 1986.
- [40] R. M. Eley, W. W. Thatcher, and F. W. Bazer, "Luteolytic effect of oestronesulphate on cyclic beef heifers," *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 55, no. 1, pp. 191–193, 1979.
- [41] H. A. Robertson and G. J. King, "Conjugated and unconjugated oestrogens in fetal and maternal fluids of the cow throughout pregnancy," *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 55, no. 2, pp. 463–470, 1979.
- [42] R. B. Heap and M. Hamon, "Oestrone sulphate in milk as an indicator of a viable conceptus in cows," *British Veterinary Journal*, vol. 135, no. 4, pp. 355–363, 1979.
- [43] M. Hamon, I. R. Fleet, R. J. Holdsworth, and R. B. Heap, "The time of detection of oestrone sulphate in milk and the diagnosis of pregnancy in cows," *British Veterinary Journal*, vol. 137, no. 1, pp. 71–77, 1981.
- [44] M. Hirako, T. Takahashi, and I. Domeki, "Peripheral changes in estrone sulfate concentration during the first trimester of gestation in cattle: comparison with unconjugated estrogens and relationship to fetal number," *Theriogenology*, vol. 57, no. 7, pp. 1939–1947, 2002.
- [45] B. S. Prakash and M. L. Madan, "Influence of gestation on oestrone sulphate concentration in milk of zebu and crossbred cows and murrah buffaloes," *Tropical Animal Health and Production*, vol. 25, no. 2, pp. 94–100, 1993.
- [46] F. Lobago, M. Bekana, H. Gustafsson et al., "Serum profiles of pregnancy-associated glycoprotein, oestrone sulphate and progesterone during gestation and some factors influencing the profiles in ethiopian borana and crossbred cattle," *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 44, no. 4, pp. 685–692, 2009.
- [47] S. Aschheim and B. Zondek, "Hypophyseorderlappen hormone und Ovarial hormone im Harn von Schwangeren," *Klinische Wochenschrift*, vol. 6, no. 28, p. 1322, 1927.
- [48] J. R. Marshall, C. B. Hammond, G. T. Ross, A. Jacobson, P. Rayford, and W. D. Odell, "Plasma and urinary chorionic gonadotropin during early human pregnancy," *Obstetrics and Gynecology*, vol. 32, no. 6, pp. 760–764, 1968.
- [49] K. Imakawa, R. V. Anthony, M. Kazemi, K. R. Marotti, H. G. Polites, and R. M. Roberts, "Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast," *Nature*, vol. 330, no. 6146, pp. 377–379, 1987.
- [50] A. C. Cavanagh, "Identification of early pregnancy factor as chaperonin 10: implications for understanding its role," *Reviews of Reproduction*, vol. 1, no. 1, pp. 28–32, 1996.
- [51] H. Morton, V. Hegh, and G. J. A. Clunie, "Studies of the rosette inhibition test in pregnant mice: evidence of immunosuppression?" *Proceedings of the Royal Society B*, vol. 193, no. 1113, pp. 413–419, 1976.
- [52] H. Morton, B. E. Rolfe, and A. C. Cavanagh, "Ovum factor and early pregnancy factor," *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 23, pp. 73–92, 1987.
- [53] H. Morton, A. C. Cavanagh, S. Athanasas-Platsis, K. A. Quinn, and B. E. Rolfe, "Early pregnancy factor has immunosuppressive and growth factor properties," *Reproduction, Fertility, and Development*, vol. 4, no. 4, pp. 411–422, 1992.

- [54] H. Morton, V. Hegh, and G. J. A. Clunie, "Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test," *Nature*, vol. 249, no. 5456, pp. 459–460, 1974.
- [55] V. G. Laleh, R. G. Laleh, N. Pirany, and M. M. Ahrabi, "Measurement of EPF for detection of cow pregnancy using rosette inhibition test," *Theriogenology*, vol. 70, no. 1, pp. 105–107, 2008.
- [56] H. Qin and Z. Q. Zheng, "Detection of early pregnancy factor in human sera," *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, vol. 13, no. 1, pp. 15–18, 1987.
- [57] Y. C. Smart, T. K. Roberts, I. S. Fraser, A. W. Cripps, and R. L. Clancy, "Validation of the rosette inhibition test for the detection of early pregnancy in women," *Fertility and Sterility*, vol. 37, no. 6, pp. 779–785, 1982.
- [58] H. Morton, G. J. A. Clunie, and F. D. Shaw, "A test for early pregnancy in sheep," *Research in Veterinary Science*, vol. 26, no. 2, pp. 261–262, 1979.
- [59] S. Wilson, R. McCarthy, and F. Clarke, "In search of early pregnancy factor: isolation of active polypeptides from pregnant ewes' sera," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 5, no. 5, pp. 275–286, 1983.
- [60] M. C. Cordoba, R. Sartori, and P. M. Fricke, "Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle," *Journal of Dairy Science*, vol. 84, no. 8, pp. 1884–1889, 2001.
- [61] B. Gandy, W. Tucker, P. Ryan et al., "Evaluation of the early conception factor (ECF[®]) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle," *Theriogenology*, vol. 56, no. 4, pp. 637–647, 2001.
- [62] C. S. Whisnant, L. A. Pagels, and M. G. Daves, "Case study: effectiveness of a commercial early conception factor test for use in cattle," *Professional Animal Scientist*, vol. 17, pp. 51–53, 2001.
- [63] A. S. Grewal, A. L. C. Wallace, Y. S. Pan et al., "Evaluation of a rosette inhibition test for pregnancy diagnosis in pigs," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 7, no. 2, pp. 129–138, 1985.
- [64] K. Ohnuma, I. T. O. Kazuei, Y.-I. Miyake, J. Takahashi, and Y. Yasuda, "Detection of early pregnancy factor (EPF) in mare sera," *Journal of Reproduction and Development*, vol. 42, no. 1, pp. 23–28, 1996.
- [65] Y. P. Cruz, L. Selwood, H. Morton, and A. C. Cavanagh, "Significance of serum early pregnancy factor concentrations during pregnancy and embryonic development in *Smithopsis macroura* (Spencer) (Marsupialia: Dasyuridae)," *Reproduction*, vol. 121, no. 6, pp. 933–939, 2001.
- [66] S. Chander, *Studies on certain immunological aspects of pregnancy diagnosis in buffaloes* [Ph.D. thesis], Chaudhary Charan Singh Haryana Agricultural University, Hisar, India, 1983.
- [67] W. R. Threlfall, "Immunosuppressive early pregnancy factor (ISEPF) determination for pregnancy diagnosis in dairy cows," *Theriogenology*, vol. 41, p. 31, 1994.
- [68] H. Morton, "Early pregnancy factor: an extracellular chaperonin 10 homologue," *Immunology and Cell Biology*, vol. 76, no. 6, pp. 483–496, 1998.
- [69] R. M. Moor and L. E. A. Rowson, "Influence of the embryo and uterus on luteal function in the sheep," *Nature*, vol. 201, no. 4918, pp. 522–523, 1964.
- [70] J. D. Godkin, F. W. Bazer, and R. M. Roberts, "Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis," *Endocrinology*, vol. 114, no. 1, pp. 120–130, 1984.
- [71] F. W. Bazer, "Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 199, no. 4, pp. 373–384, 1992.
- [72] R. M. Roberts, D. W. Leaman, and J. C. Cross, "Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 200, no. 1, pp. 7–18, 1992.

- [73] R. M. Roberts, "Interferon-tau, a type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 18, no. 5-6, pp. 403–408, 2007
- [74] G. E. Mann, G. E. Lamming, R. S. Robinson, and D. C. Wathes, "The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy," *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, vol. 54, pp. 317–328, 1999.
- [75] R. M. Roberts, A. D. Ealy, A. P. Alexenko, C.-S. Han, and T. Ezashi, "Trophoblast interferons," *Placenta*, vol. 20, no. 4, pp. 259–264, 1999.
- [76] W.W.Thatcher,M.D.Meyer,andG.Danet-Desnoyers,"Maternal recognition of pregnancy," *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, vol. 49, pp. 15–28, 1995.
- [77] F. W. Bazer, T. E. Spencer, and T. L. Ott, "Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 37, no. 6, pp. 412–420, 1997.
- [78] T. E. Spencer and F. W. Bazer, "Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium," *Endocrinology*, vol. 137, no. 3, pp. 1144–1147, 1996.
- [79] C. W. Xiao, B. D. Murphy, J. Sirois, and A. K. Goff, "Down-regulation of oxytocin-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase expression by interferon- τ in bovine endometrial cells," *Biology of Reproduction*, vol. 60, no. 3, pp. 656–663, 1999.
- [80] T. E. Spencer, N. H. Ing, T. L. Ott et al., "Intrauterine injection of ovine interferon- τ alters oestrogen receptor and oxytocin receptor expression in the endometrium of cyclic ewes," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 15, no. 2, pp. 203–220, 1995.
- [81] J. F. Oliveira, L. E. Henkes, R. L. Ashley et al., "Expression of interferon(IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- τ release from the uterine vein," *Endocrinology*, vol. 149, no. 3, pp. 1252–1259, 2008.
- [82] C. A. Gifford, K. Racicot, D. S. Clark et al., "Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows," *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 1, pp. 274–280, 2007.
- [83] H. Han, K. J. Austin, L. A. Rempel, and T. R. Hansen, "Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows," *Journal of Endocrinology*, vol. 191, no. 2, pp. 505–512, 2006.
- [84] J. C. Green, C. S. Okamura, S. E. Poock, and M. C. Lucy, "Measurement of interferon-tau (IFN- τ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20 days after insemination in dairy cattle," *Animal Reproduction Science*, vol. 121, no. 1-2, pp. 24–33, 2010.
- [85] N. Forde, F. Carter, T. E. Spencer et al., "Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant?" *Biology of Reproduction*, vol. 85, no. 1, pp. 144–156, 2011.
- [86] K. Kizaki, A. Shichijo-Kizaki, T. Furusawa, T. Takahashi, M. Hosoe, and K. Hashizume, "Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 11, article 6, 2013.
- [87] F. B. P. Wooding and D. C. Wathes, "Binucleate cell migration in the bovine placenta," *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 59, no. 2, pp. 425–430, 1980.
- [88] F. W. Bazer, W. W. Thatcher, P. J. Hansen, M. A. Mirando, T. L. Ott, and C. Plante, "Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants," *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, vol. 43, pp. 39–47, 1991.
- [89] A. P. Zoli, P. Demez, J. F. Beckers, M. Reznik, and A. Beckers, "Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated glycoprotein in the bovine placenta," *Biology of Reproduction*, vol. 46, no. 4, pp. 623–629, 1992.

- [90] J. E. Butler, W. C. Buntington, R. G. Sasser, C. A. Ruder, G. M. Hass, and R. J. Williams, "Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins," *Biology of Reproduction*, vol. 26, no. 5, pp. 925–933, 1982.
- [91] A. P. Zoli, J.-F. Beckers, P. Wouters-Ballman, J. Closset, P. Falmagne, and F. Ectors, "Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein," *Biology of Reproduction*, vol. 45, no. 1, pp. 1–10, 1991.
- [92] S. Xie, B. G. Low, R. J. Nagel et al., "Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 22, pp. 10247–10251, 1991.
- [93] S. Xie, B. G. Low, R. J. Nagel, J.-F. Beckers, and R. M. Roberts, "A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoblast," *Biology of Reproduction*, vol. 51, no. 6, pp. 1145–1153, 1994.
- [94] F. Constanta, S. Camous, P. Chavatte-Palmera et al., "Altered secretion of pregnancy-associated glycoproteins during gestation in bovine somatic clones," *Theriogenology*, vol. 76, pp. 1006–1021, 2011.
- [95] M. M. Mialon, S. Camous, G. Renand, J. Martal, and F. M'enisier, "Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle," *Reproduction, Nutrition, Development*, vol. 33, no. 3, pp. 269–282, 1993.
- [96] J. Martal, N. Chêne, S. Camous et al., "Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN- γ and other cytokines in early pregnancy," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 9, no. 3, pp. 355–380, 1997.
- [97] J. A. Green, S. Xie, X. Quan et al., "Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy," *Biology of Reproduction*, vol. 62, no. 6, pp. 1624–1631, 2000.
- [98] S. Xie, J. Green, J. B. Bixby et al., "The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 24, pp. 12809–12816, 1997.
- [99] K. Klisch, A. Boos, M. Friedrich et al., "The glycosylation of pregnancy-associated glycoproteins and prolactin-related protein-I in bovine binucleate trophoblast giant cells changes before parturition," *Reproduction*, vol. 132, no. 5, pp. 791–798, 2006.
- [100] B. P. V. L. Telugu, A. M. Walker, and J. A. Green, "Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family—analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes," *BMC Genomics*, vol. 10, article 185, pp. 1–17, 2009.
- [101] P. Humblot, S. Camous, J. Martal et al., "Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows," *Theriogenology*, vol. 30, no. 2, pp. 257–267, 1988.
- [102] G. H. Kiracofe, J. M. Wright, R. R. Schalles, C. A. Ruder, S. Parish, and R. G. Sasser, "Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows," *Journal of Animal Science*, vol. 71, no. 8, pp. 2199–2205, 1993.
- [103] A. P. Zoli, L. A. Guilbault, P. Delahaut, W. B. Ortiz, and J.-F. Beckers, "Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis," *Biology of Reproduction*, vol. 46, no. 1, pp. 83–92, 1992.
- [104] R. G. Sasser, C. A. Ruder, K. A. Ivani, J. E. Butler, and W. C. Buntington, "Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation," *Biology of Reproduction*, vol. 35, no. 4, pp. 936–942, 1986.

- [105] J. A. Green, T. E. Parks, M. P. Avalle et al., "The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glyco- proteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers," *Theriogenology*, vol. 63, no. 5, pp. 1481–1503, 2005.
- [106] E. Silva, R. A. Sterry, D. Kolb et al., "Accuracy of a pregnancy- associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination," *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 10, pp. 4612– 4622, 2007.
- [107] A. Ayad, N. M. Sousa, J. Sulon, J. L. Hornick, M. Iguer- Ouada, and J. F. Beckers, "Correlation of five radioimmunoassay systems for measurement of bovine plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations at early pregnancy period," *Research in Veterinary Science*, vol. 86, no. 3, pp. 377– 382, 2009.
- [108] N. M. de Sousa, M. Zongo, W. Pitala et al., "Pregnancy- associated glycoprotein concentrations during pregnancy and the postpartum period in Azawak Zebu cattle," *Theriogenology*, vol. 59, no. 5-6, pp. 1131–1142, 2003.
- [109] A. Karen, S. Darwish, A. Ramoun et al., "Accuracy of ultra- sonography and pregnancy-associated glycoprotein test for pregnancy diagnosis in buffaloes," *Theriogenology*, vol. 68, no. 8, pp. 1150–1155, 2007.
- [110] N. M. Sousa, A. Ayad, J. F. Beckers, and Z. Gajewski, "Preg- nancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in theruminants," *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 57, no. 8, pp. 153–171, 2006.
- [111] P. R. Graves and T. A. J. Haystead, "Molecular biologist's guide to proteomics," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 66, no. 1, pp. 39–63, 2002.
- [112] J. D. Lippolis and T. A. Reinhardt, "Centennial paper: proteomics in animal science," *Journal of Animal Science*, vol. 86, no. 9, pp. 2430–2441, 2008.
- [113] D. A. Colantonio and D. W. Chan, "The clinical application of proteomics," *Clinica Chimica Acta*, vol. 357, no. 2, pp. 151–158, 2005.
- [114] F. di Girolamo, E. Boschetti, M. C. M. Chung, F. Guadagni, and P. G. Righetti, "Proteomineering' or not? The debate on biomarker discovery in sera continues," *Journal of Proteomics*, vol. 74, no. 5, pp. 589–594, 2011.
- [115] D. I. Jin, H. R. Lee, H. R. Kim, H. J. Lee, J. T. Yoon, and C. S. Park, "Proteomics analysis of pregnancy-specific serum proteins in bovine," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 18, no. 1-2, p. 183, 2005.
- [116] R. Han, H. R. Kim, K. Naruse et al., "Identification of bovine pregnancy-specific milk proteins using proteomics," *Biology of Reproduction*, vol. 78, p. 143, 2008.
- [117] A. K. Balhara, *Proteomic analysis of pregnancy-specific serum proteins in buffalo [Ph.D. thesis]*, LLRUVAS, Hisar, India, 2012.
- [118] A. Busch, S. Michel, C. Hoppe, D. Driesch, U. Claussen, and F. von Eggeling, "Proteome analysis of maternal serum samples for trisomy 21 pregnancies using ProteinChip arrays and bioinformatics," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 53, no. 3, pp. 341–343, 2005.
- [119] P. A. Benn, "Advances in prenatal screening for Down syndrome: I. General principles and second trimester testing," *Clinica Chimica Acta*, vol. 323, no. 1-2, pp. 1–16, 2002.

Sintetik Media untuk Kultur, Pembekuan dan Vitrifikasi Embrio Sapi

J. F. Hasler

Bioniche Kesehatan Hewan, Inc, NE1335 Drive View Terre, Pullman, WA 99163, USA.

Email: jfhasler05@msn.com

Abstrak

Media yang dirancang untuk memegang, pemulihan dan kriopreservasi embrio sapi dan kuda yang tersedia dari beberapa sumber komersial. Dalam beberapa tahun terakhir, beberapa media yang mengandung bovine serum, walaupun masuknya serum dalam media transfer embrio kini sebagian besar dihentikan karena masalah yang berkaitan dengan penyimpanan dan biosekuriti. Saat ini, bovine serum albumin (BSA) dimasukkan dalam media paling komersial diproduksi untuk digunakan pada transfer embrio (ET). Meskipun BSA berisiko kurang dari serum untuk transmisi penyakit menular, inklusi masih mengandung risiko kontaminasi virus. Tinjauan ini secara ringkas menjelaskan berbagai komponen media ET dan pengembangan media ET berkhasiat tidak mengandung produk-produk yang berasal dari hewan. Sebuah evaluasi keefektifan pemulihan, pembekuan memegang, dikontrol lambat dan media vitrifikasi dalam penelitian dan pengaturan transfer embrio komersial ET juga disajikan.

Kata kunci : embryo media, embryo transfer, media formulations.

Pengantar

The Internasional Embryo Transfer Society (IETS) melaporkan bahwa lebih dari 120.000 donor sapi disuperovulasi dan dipanen pada tahun 2007, sehingga pemulihan lebih dari 750.000 embrio (Thibier 2008). Transfer embrio sapi (ET) industri secara luas didistribusikan secara internasional dan mungkin jauh lebih besar daripada yang ditunjukkan oleh angka di atas, yang dikumpulkan secara sukarela setiap tahun. Selama tahap awal pengembangan industri ET komersial sapi, tidak ada produsen komersial peralatan ET dan perlengkapan, mengharuskan improvisasi. Garam Dulbecco's fosfat-buffered (D-PBS), solusi sederhana garam anorganik, digunakan secara luas untuk kedua pembilasan dan memegang embrio dan berbagai formulasi, mengandung baik serum atau albumin bovine serum (BSA), yang digunakan berhasil (Seidel 1981; Wright 1981). Tingkat Kebuntingan lebih dari 70% yang dilaporkan ketika diubah D-PBS yang mengandung glukosa dan piruvat dengan serum anak sapi 1% bayi baru lahir digunakan untuk pembilasan dan serum anak sapi baru lahir 10% digunakan untuk memegang (Hasler *et al.*, 1987).

Meskipun serum telah digunakan dengan sukses di media pembekuan embrio, protokol untuk pergerakan internasional embrio beku sapi semakin dilarang penggunaannya. Serum, dan pada tingkat lebih rendah BSA, menyajikan risiko kontaminasi patogen (Givens dan Marley 2008). Selain itu, dimasukkannya serum dalam media cair non-beku adalah problematis dalam kaitannya dengan penyimpanan / umur simpan. Akibatnya, BSA has digantikan serum sebagai komponen makromolekul media ET. Meskipun BSA memiliki risiko yang lebih sedikit dari patogen yang mengandung, tidak bisa dihasilkan benar-benar gratis dan patogen iradiasi gamma dapat menurunkan BSA (Gaber 2005).

Sebagian besar dari apa yang diketahui tentang mempertahankan embrio hewan ternak berasal dari penelitian yang melibatkan kultur *in vitro*. Informasi dari ET komersial tersebut, seringkali anekdot dan tidak dikendalikan dengan baik, dan sulit untuk memperoleh data melibatkan transfer sebenarnya dari embrio, dengan

kebuntingan sebagai titik akhir. Membuktikan bahwa penggunaan satu hasil menengah dalam angka kebuntingan meningkat dibandingkan dengan yang lain memerlukan sejumlah besar hewan, dan karena tingkat kebuntingan di ET komersial umumnya cukup tinggi, perbaikan biasanya bertahap kecil; perbaikan besar tidak mungkin terjadi di masa depan.

Masalah dengan penerapan metode statistik dengan perbedaan yang diamati dalam angka kebuntingan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dijelaskan baru-baru ini (Chapman dan Seidel 2008). Untuk menunjukkan perbedaan statistik dengan $P < 0,05$, berdasarkan kekuatan 0,90, dengan tingkat kebuntingan sebesar 60% dan 70% untuk dua kelompok yang berbeda dengan menggunakan uji dua sisi memerlukan transfer embrio 496 di setiap group. Although peningkatan atau penurunan 10 persentase poin di ET komersial dapat menjadi sangat penting finansial, sangat menantang dan mahal untuk desain studi praktis untuk menunjukkan perbedaan besarnya itu.

Berbagai media komersial yang dirancang khusus untuk pembilasan donor, memegang dan cryopreserving embrio yang tersedia. Banyak mengandung satu atau lebih bahan yang berasal dari hewan dan sebagian besar tidak dirumuskan berdasarkan uji coba yang sebenarnya melibatkan angka kebuntingan di lapangan. Banyak dari apa yang diketahui tentang optimalisasi pembilasan dan memegang media telah datang dari penelitian yang melibatkan dalam produksi *in vitro* embrio ternak. Namun, dalam ET konvensional, embrio 6-8 hari-tua sembuh dengan bantuan 'pemulihan' 'flush' atau media dari rahim betina donor dan kemudian disimpan media 'memegang' dalam untuk periode variabel sebelum baik transfer atau kriopreservasi. Meskipun ada sejumlah besar literatur yang berhubungan dengan optimasi media yang digunakan dalam kultur *in vitro* sapi (IVC), banyak dari pekerjaan ini tidak berlaku untuk media untuk menyimpan embrio selama prosedur ET karena: (1) Persyaratan untuk perubahan IVC dari waktu ke waktu, sehingga komposisi ideal untuk media di 3 hari ini berbeda dengan bahwa pada 7 hari pembangunan; dan (2) embrio biasanya diadakan di media cair selama berjam-jam selama prosedur ET, berbeda dengan hari untuk IVC. Karakteristik penting dari media IVC telah tercakup di tempat lain (Thompson 2000; Gardner 2008).

Tidak ada penelitian yang diterbitkan yang menunjukkan kebutuhan untuk menghasilkan media yang berbeda baik untuk pemulihan atau induk dari embrio kuda dan ternak. Bahkan, ada bukti yang tidak dipublikasikan berlimpah dari industri ET komersial yang media yang sama dapat digunakan dengan sangat sukses untuk kedua spesies. Selain itu, sedikit perhatian telah diberikan kepada produksi komersial media untuk ET pada domba, kambing, babi dan camelids. Namun demikian, saat ini tersedia ET media yang paling mungkin cukup tepat untuk digunakan dalam spesies.

Morulae sapi dan kuda dan blastosis akhir sebenarnya agak sulit, organisme fleksibel. Mereka dapat menangani berbagai macam formulasi cukup pH, osmolaritas, suhu dan media untuk jangka waktu berkisar hingga jam, atau bahkan sehari, tanpa konsekuensi serius. Konsep 'plastisitas embrio' telah ditekankan by Thompson *et al.*, (2007). Para penulis ini menegaskan bahwa embrio sering dapat bertahan dalam kondisi yang merupakan stres negatif. Meskipun demikian, mereka juga membuat titik yang menekankan bahwa pengaruh negatif perkembangan embrio harus dihindari. Dengan demikian, media ET formulasi, dalam batas yang wajar, harus didasarkan pada pengetahuan ilmiah terbaik yang tersedia.

Meskipun angka kebuntingan memuaskan sering telah dicapai dalam kurang dari kondisi ideal, sedikit yang diketahui tentang efek berpotensi halus pada keturunan

(misalnya konsentrasi oksigen selama mouse di pematangan oosit *in vitro* tidak mempengaruhi angka kebuntingan, tetapi tidak mempengaruhi berat badan janin dan plasenta; Banwell *et al.*, 2007). Demikian pula, Watkins *et al.*, (2007) melaporkan bahwa kondisi embrio tikus kultur terpengaruh tekanan darah sistolik pascakelahiran. Meskipun perubahan halus dalam ternak tidak mungkin untuk diperhatikan, bukan masalah jadi halus dengan berat lahir janin janin dan kesehatan secara keseluruhan pada domba (Thompson *et al.*, 1995.) dan ternak (Farin *et al.*, 2001) telah dicatat ketika serum dimasukkan selama IVC. Di samping itu, efek yang mungkin perkembangan janin dan kesehatan hewan ternak yang dihasilkan dari gangguan dalam pemulihan, memegang dan media kriopreservasi tidak dapat diabaikan.

Kesepakatan kertas hadir dengan pengembangan dan pengujian media sintetik dan alamat pertanyaan apakah setiap agen biologi adalah komponen penting dari media ET berkhasiat. Media sintetis, dalam konteks tulisan ini adalah orang-orang media yang tidak mengandung produk-produk yang berasal dari hewan. Penggunaan media sintetis sangat mengurangi kemungkinan patogen hewan yang ditularkan kepada embrio, penerima atau keturunan dari bahan-bahan seperti serum, BSA, transferin atau katalase. Selain itu, media sintetis umumnya tidak memerlukan pendinginan selama transportasi dan penyimpanan.

Beberapa media yang dijelaskan dalam makalah ini dirumuskan dalam sebuah kolaborasi antara Reproduksi dan Bioteknologi Hewan Laboratorium (ARBL), Colorado State University (CSU, Ft Collins, CO, USA) dan Bioniche Kesehatan Hewan, Inc (Pullman, WA, USA). Selain itu, media diuji dalam beberapa percobaan yang melibatkan beberapa praktisi komersial ET. Meskipun percobaan ini tidak dilakukan dengan cara yang buta, mereka berdasarkan rata-rata kebuntingan setelah transfer embrio dari kontrol v. media eksperimental.

Komponen Media Transfer Embrio : Pengumpulan dan Penyimpanan

Air dan Garam

Purewater adalah komponen media embrio yang paling melimpah dan dianggap sebagai komponen yang paling penting dari media untuk embrio. Apa yang merupakan air murni dan bagaimana cara terbaik untuk menghasilkan telah baik tertutup review Wiemer *et al.*, (1998). Beberapa garam, seperti natrium klorida dan fosfat kalium, adalah komponen dari hampir semua media yang digunakan dalam ET. Komponen-komponen ini, dan semua bahan kimia yang digunakan dalam pembuatan media, harus kualitas pereaksi dan harus disertifikasi sebagai telah 'embrio mencit diuji'.

Sumber Energi

Glukosa dan atau piruvat hampir selalu disertakan dalam media ET sebagai sumber energi. Kadar glukosa Optimal untuk embrio sapi rendah (sekitar 0,5 mM) selama perkembangan embrio awal, tetapi kadar glukosa tinggi yang diinginkan setelah tahap morula tercapai; paling ET media yang mengandung glukosa sekitar 2,0 mM. Namun, kurangnya sumber energi tertentu tidak mungkin sangat berbahaya untuk embrio sapi ketika mereka dipelihara dalam medium cair untuk jangka waktu hanya beberapa jam. Tidak ada penelitian yang diterbitkan berurusan dengan isu ini dan tes akhir akan memerlukan transfer jumlah yang sangat besar embrio.

Makromolekul

Untuk keperluan makalah ini, makromolekul termasuk serum, BSA, asam hyaluronic (HA) dan molekul sintetik, seperti polivinil alkohol (PVA). Alasan yang paling penting untuk memasukkan makromolekul dalam media ET mungkin sifat surfaktan mereka, yang mengurangi kemungkinan bahwa embrio akan mengambang atau menempel pada peralatan. Lebih khusus, serum berisi berbagai komponen, seperti protein, faktor pertumbuhan, vitamin, mineral dan substrat energi, yang bermanfaat untuk pengembangan embrio dan telah menunjukkan bahwa serum mempromosikan pembangunan blastosis (Van Langendonck *et al.*, 1997.). Serum dan BSA juga menyediakan beberapa sifat fisik, termasuk kelasi, regulasi osmotik koloid dan serum regulation. Although pH telah digunakan sangat berhasil menghasilkan tingkat suku bunga yang tinggi dalam perkembangan blastosis sapi di IVC, dimasukkannya serum juga telah dikaitkan dengan tingkat tinggi kebuntingan abnormal dan keturunan, disebut sebagai sindrom keturunan besar (LOS; Young *et al.*, 1998; Hasler 2000; Farin *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2007).

Meskipun BSA belum secara khusus dikaitkan dengan LOS, tidak ada data yang berhubungan dengan efek samar kemungkinan BSA pada embrio, tingkat kebuntingan atau keturunan berikutnya. Tampaknya tidak mungkin bahwa BSA merupakan resiko besar, karena hadir pada konsentrasi tinggi dalam cairan oviducal dan rahim (Tervit *et al.*, 1972). Namun, semua BSA tidak sama dan sumber berbagai BSA diketahui bervariasi dalam kemampuan mereka untuk mendukung pengembangan blastosis dalam kultur (Sung *et al.*, 2004). Manfaat dari albumin dalam kultur embrio telah dikaji oleh Thompson (2000), ia mengusulkan albumin yang memiliki peran nutrisi penting selama perkembangan embrio, terutama pasca-pemadatan. Namun demikian, karya ini didasarkan pada kultur embrio dari saat fertilisasi ke tahap blastosis dan ada tidak ada data yang dipublikasikan menunjukkan bahwa BSA diperlukan selama periode waktu yang relatif singkat bahwa embrio yang diadakan di media cair selama prosedur ET.

Media sintesis embrio flush atau pemulihan, dirumuskan tanpa komponen yang berasal dari hewan, telah tersedia secara komersial sejak tahun 1996, ketika ViGROTM Lengkap Flush (Bioniche Hewan Kesehatan) PVA mengandung sebagai surfaktan diperkenalkan. Media ini telah digunakan dalam ribuan donor sapi dengan hasil sangat memuaskan. Sebaliknya, ada persepsi yang tak tercatat di antara praktisi kuda Amerika bahwa media flush mengandung BSA lebih unggul untuk media yang mengandung PVA. Dalam sebuah percobaan yang dilakukan pada kuda di ARBL, embrio kuda itu kembali with ViGROTM Lengkap Flush, containing PVA, atau EmcareTM Lengkap Ultra Flush (ICPbio, Auckland, Selandia Baru), mengandung BSA. Embrio pemulihan dan kualitas yang hampir identik dalam perbandingan percobaan ini (Tabel 1) (P. McCue, E. Squires, unpubl. data).

Asam Hyaluronic adalah glikosaminoglikan yang hadir dalam cairan folikel, oviducal dan rahim (Lee dan Ax 1984). Embrio memiliki reseptor permukaan untuk HA dan terlibat dalam regulasi ekspresi gen, proliferasi sel dan diferensiasi. Penambahan HA dengan sistem kultur embrio sapi meningkatkan pengembangan ke tahap blastosis dan meningkatkan tingkat penetasan (Furnus *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 2003; Blok *et al.*, 2009). Embrio sapi dibiakkan dalam HA juga dipamerkan meningkatkan cryosurvival (Lane *et al.*, 2003; Palasz *et al.*, 2008b; Blok *et al.*, 2009). Pada tikus, dimasukkannya HA dalam medium kultur adalah sama khasiatnya sebagai BSA dan meningkatkan angka kebuntingan bahkan ketika hanya dalam medium untuk transfer (Gardner *et al.*, 1999).

Asam Hyaluronic adalah komponen dari media memegang SYNGRO ® (Bioniche Kesehatan Hewan), medium sintetik diformulasikan untuk memegang sapi, kuda, kambing domba dan embrio antara pemulihan dan transfer atau kriopreservasi. Sebelum komersialisasi pada tahun 2005, lima komersial sapi ET praktisi melaporkan tingkat kebuntingan rata-rata 65% setelah transfer dari 80 embrio yang diselenggarakan dalam pemulihan ® SYNGRO berikut (B. Stroud, L. Kennel, A. Rushmer, R. Saúve, J. Webb , unpubl. data). HA digunakan dalam SYNGRO ® diproduksi biosynthetically oleh fermentasi, yang tidak melibatkan produk-produk yang berasal dari hewan.

Asam amino

Penambahan semua 20 asam amino esensial dan non-penting untuk sistem kultur embrio hampir universal. Peran asam amino tertentu individu dalam perkembangan embrio dan dalam meningkatkan viabilitas mereka telah dibahas di tempat lain (Gardner 2008). Masuknya asam amino tampaknya pengganti untuk beberapa manfaat yang menyediakan serum di media embrio.

Anti-oksidan dan chelators

Anti-oksidan mengurangi pembentukan radikal bebas yang merusak, sedangkan chelators adalah zat kimia yang mengikat ion logam berat di media. Glutathione, BSA, piruvat, asam askorbat dan katalase yang sering digunakan sebagai anti-oksidan dalam media embrio. Dalam sebuah media sempurna murni, tidak akan ada kebutuhan untuk chelators, tapi logam berat bisa masuk ke viawater formulasi atau garam reagen. Transferrin, BSA dan EDTA yang chelators. Namun, BSA, katalase dan transferin berasal dari hewan dan tidak sesuai untuk media sintetik.

Osmolytes

Osmolytes adalah senyawa organik yang berperan dalam menjaga keseimbangan cairan dan volume sel dan organel. Ketika sel membengkak akibat tekanan osmotik eksternal, membran saluran terbuka dan memungkinkan penghabisan dari osmolytes, yang membawa air dengan mereka, mengembalikan volume sel normal. Glycine merupakan osmolyte dan terkecil dari asam non-essential amino disebut 'yang biasanya ditambahkan ke media embrio. Dasar fisiologis untuk sifat osmolyte glisin dalam kultur embrio telah dijelaskan secara detail oleh Steeves *et al.*, (2003).

pH (dan buffer)

Meskipun tidak ada penelitian diterbitkan berurusan dengan pH ideal untuk mengadakan embrio jenis kuda atau lembu selama prosedur ET, umumnya disepakati bahwa pH dalam rentang 7,2-7,4 yang diinginkan. PH intraselular pada embrio sapi *in vitro* yang dilemahkan 7.2, yang diukur dengan pH probe-sensitif (Lane dan Bavister 1999). Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa embrio sapi dalam kultur dikenakan pH asam pulih jauh lebih mudah daripada dari pH dasar. Dalam studi klasik, Kane (1974) menunjukkan bahwa persentase tertinggi blastosis kelinci yang menetas selama IVC terjadi pada kisaran pH 7,2-7,4, dengan penurunan terjal ketika pH di bawah 7,0 atau di atas 7,8.

Fosfat di PBS bukanlah penyangga yang efektif, tetapi pemasukan baik serum atau BSA buffering menambah kapasitas untuk media ini. Sebagian besar media komersial untuk digunakan dalam prosedur ET mengandung baik 3 - asam [N-morpholino] propanesulfonic (MOPS) atau buffer HEPES zwitterionic. Perkembangan

embrio sapi untuk blastosis tidak substansial berubah saat oosit dan / atau embrio yang terkena salah satu dari dua buffer dalam medium albumen Tyrode dimodifikasi dengan piruvat (TALP) media pada pH 7,2 (*et al.*, Palasz 2008a.). Namun, dengan waktu paparan yang sama untuk PBS, juga pada pH 7,2, pengembangan secara signifikan terbelakang dan tingkat transkripsi dari beberapa gen terpengaruh.

Osmolaritas

Osmolaritas optimal untuk memelihara sapi, kelinci, tikus dan embrio babi selama prosedur ET adalah sekitar 275 mOsmol (Baltz 2001). Meskipun embrio sapi dan kuda mungkin tidak terpengaruh oleh paparan osmolarities berkisar 250-300 mOsmol untuk waktu yang relatif singkat, sebuah osmolaritas total antara 250 dan 270 mOsmol tampaknya optimal dalam embrio *in vitro*-berasal kultur dalam simplex kalium menengah tinggi optimasi yang diturunkan (KSOM) untuk jangka waktu yang lama (Liu dan Foote 1996). Pertimbangan penting ketika menyesuaikan osmolaritas media adalah masalah yang molekul ditambahkan atau dihapus untuk menaikkan atau osmolaritas rendah. Garam yang paling berlimpah di semua media embrio NaCl, yang telah terbukti merugikan bovine (Liu dan Foote 1996) dan kelinci (Li dan Foote 1996) embrio pada konsentrasi di atas 95 mM. Karena cairan saluran telur adalah > 300 mOsmol, manfaat memiliki osmolaritas <300 mOsmol mungkin karena menurunkan Na^+ .

Tabel 1. Perbandingan kualitas embrio dan efisiensi pemulihan di kuda merah dengan media yang mengandung alkohol polivinil (ViGRO™; Bioniche Kesehatan Hewan, Pullman, WA, USA) v. serum albumin bovine (Emcare™; ICPbio, Auckland, Selandia Baru)

Data tidak dipublikasikan dan diberikan oleh Reproduksi Ternak dan Laboratorium Bioteknologi, Colorado State University (Ft Collins, CO, USA). PVA, polivinil alkohol; BSA, bovine serum albumin

	ViGRO™ (PVA)	Emcare™ (BSA)
Embryo quality ^A	1.17 (n=66)	1.22 (n=71)
Recovery efficiency ^B	42/54 (78)	58/76 (76)

^ABerdasarkan sistem di mana suatu embrio yang sangat baik dinilai '1', sedangkan embrio yang adil dinilai '3'.

^BData menunjukkan jumlah embrio per flush, dengan persentase yang diberikan dalam tanda kurung.

Media Embrio Transfer: kriopreservasi Slow dikendalikan pembekuan

Pembekuan Lambat terkendali, juga disebut sebagai pembekuan konvensional atau keseimbangan, biasanya melibatkan penggunaan freezer diprogram untuk menurunkan suhu pada tingkat perkiraan 0,5 ° C/min-1 dari suhu penyemaian antara -5 dan -7 ° C untuk antara -30 dan -35 ° C, di mana embrio jatuh ke dalam nitrogen cair. Meskipun gliserol atau dimetilsulfoksida (DMSO) sebagai krioprotektan bersama dengan serum 10% telah bahan baku dalam media beku embrio, 0,4% BSA telah menggantikan serum. Namun, Voelkel dan Hu (1992) memperkenalkan penggunaan ethylene glycol (EG) sebagai krioprotektan pada tahun 1992. Molecularweight The ofEGis cukup embrio lowthatwhen dicairkan dan ditempatkan ke dalam lingkungan isotonik, maka sel-sel embrio keluar hampir secepat masuknya air untuk mencapai kesetimbangan osmotik tanpa pembengkakan dan sel pecah. Dengan demikian, penggunaan EG memungkinkan embrio akan dicairkan dan ditransfer langsung ke dalam rahim penerima tanpa kerusakan osmotik, sebuah sistem yang dikenal sebagai transfer langsung (DT).

Tabel 2. Rataan kebuntingan pada transfer embrio sapi yang dibekukan di etilen glikol komersial (EG) dengan medium pembekuan yang mengandung albumin bovine serum (ViGROTM Ethylene Glycol Bekuan Plus dengan Sukrosa; BionicheAnimal Kesehatan, Pullman, WA, USA) vs sintetis EG medium yang mengandung polivinil alkohol (SYNGRO[®] etilena glikol FREEZE; Bioniche Kesehatan Hewan)

a,b Persentase dalam kolom dengan huruf superscript berbeda berbeda secara signifikan ($P < 0,02$; Fisher exact test). PVA, alkohol polivinil; BSA, bovine serum albumin

Trial	BSA		Synthetic (PVA)	
	No. pregnancies/no. transfers	% Pregnancies	No. pregnancies/no. transfers	% Pregnancies
1	104/193	53.9	113/195	58.0
2	4/14	28.6	18/31	58.1
3	5/10	50.0	12/20	60.0
4	12/49	24.5a	22/44	50.0b
Total	125/266	47.0a	165/290	56.9b

Karena kenyamanan dan diadopsi secara luas, DT telah menjadi standar dalam industri ET. Tingkat Konsepsi embrio beku dengan EG vs gliserol dalam industri ET Kanada dan Amerika telah disusun dan ditemukan sangat mirip (Leibo dan Mapletoft 1998). Pada tahun 2007, anggota bersertifikat dari Embryo Transfer American Association melaporkan mengumpulkan lebih dari 330 000 embrio sapi, yang 65% dibekukan setelah koleksi. Dari mereka, 4% dibekukan di gliserol, sedangkan 96% dari embrio yang beku dengan EG untuk DT.

Dengan tujuan menghilangkan BSA dalam media pembekuan, sebuah uji coba lapangan dengan membandingkan PVA BSA menggunakan embrio beku di EG untuk DT dilakukan (A. Rushmer, B. Stroud, G. Bo, unpubl. data). Media dasar yang mengandung PVA adalah SYNGRO[®] (Bioniche Kesehatan Hewan), yang juga mengandung HA, yang telah terbukti meningkatkan kelangsungan hidup embrio sapi beku-dicairkan ketika hadir dalam medium pembekuan (Palasz *et al.*, 1993. 2000). SYNGRO[®] mengandung HA bawah paten dipegang oleh VetrepHarm, Inc, sebuah perusahaan yang sekarang bagian dari Bioniche Kesehatan Hewan, Inc (Alkemade *et al.*, 1992). Hasil uji coba ini jelas menunjukkan bahwa media ini, dikenal sebagai SYNGRO[®] etilen glikol FREEZE (Bioniche Kesehatan Hewan), dilakukan secara statistik lebih baik daripada beku menengah EG konvensional (Tabel 2). Namun, hasil tidak secara spesifik membuktikan bahwa PVA, ketika digunakan dalam media beku, lebih tinggi kepada BSA; SYNGRO dasar kimia[®] adalah sangat berbeda dari basis yang digunakan dalam media beku mengandung BSA. Dalam hal apapun, perumusan mengandung PVA dilakukan sangat sesuai dalam persidangan.

ViGRO AG FreezeTM (Bioniche Kesehatan Hewan) adalah media lain membeku sintetik yang telah digunakan dengan sukses dalam kriopreservasi dan DT embrio sapi di ET komersial. Ini adalah fosfat dimodifikasi Dulbecco's buffered saline menengah (MDPBS) solusi berbasis mengandung 1.4m EG dengan arabinogalactan (AG) dan 2,0 mgmL⁻¹ PVA. AG adalah sel tumbuhan yang diturunkan dari dinding polisakarida yang dipatenkan untuk digunakan dalam media krioprotektan untuk embrio, sperma atau sel-sel somatik (Oliver dan Ellington 1999). Media ini telah digunakan terutama untuk embrio beku yang telah mengalami biopsi untuk penentuan jenis kelamin. Darrow (2001) melaporkan angka kebuntingan di atas 50% untuk embrio yang dibiopsi untuk sexing kemudian beku dalam media ini dan ditransfer langsung (DT) setelah thawing.

Vitrifikasi

Vitrifikasi, yang melibatkan penggunaan larutan berkonsentrasi tinggi agen cryoprotective yang mencegah pembentukan kristal es selama pendinginan, pertama kali digambarkan sebagai metode untuk kriopreservasi embrio mamalia oleh Rall dan Fahy (1985). Keunggulan dan karakteristik teknologi vitrifikasi telah dibahas di tempat lain (Vajta dan Nagy 2006). Sebagian besar pendekatan untuk vitrifikasi melibatkan sangat pendinginan cepat dengan bantuan perangkat khusus dan kontainer. Namun, dari sudut pandang praktis, tidak ada sistem ini memungkinkan DT embrio ke penerima dari perangkat di mana mereka membantu; vitrifikasi sistem yang tidak memungkinkan DT tidak akan mungkin dapat diterima industri ET komersial.

Sebuah makalah pada tahun 1993 pada sistem DT untuk vitrifikasi embrio sapi *in vivo* yang diturunkan dalam straw 0,25 mL dilaporkan cukup rata-rata kebuntingan rendah (Ishimori *et al.*, 1993.). Namun, van Wagendonk-Leeuw *et al.*, (1997) melaporkan angka kebuntingan hampir identik untuk 728 pada embrio sapi *in vivo* yang dibekukan baik secara perlahan 10% gliserol beku atau membantu dalam gliserol 6,5 juta dalam sedotan 0,25 mL berisi kolom 1M pengencer sukrosa. Baru-baru ini, peneliti di ARBL melaporkan angka kelangsungan hidup yang tinggi dari kedua sapi *in vivo* dan *in vitro*-embrio yang berasal vitrifikasi di 7M EG di sedotan 0,25 mL berisi kolom 0.5m medium pengenceran galaktosa (Campos-Chillon *et al.*, 2006). Dalam penelitian tersebut, hidup dalam kultur setelah pemanasan hampir 100% untuk *in vivo* embrio yang diturunkan dan lebih dari 80% dalam embrio *in vitro*-berasal. Studi selanjutnya menunjukkan thatPVAcould diganti forBSAin media vitrifikasi tanpa kehilangan efikasi (Walker dan Seidel 2006). Hal ini menyebabkan produk komersial tanpa komponen yang berasal dari hewan (SYNGRO ® vitrifikasi kit sapi; Bioniche Kesehatan Hewan). Kit ini telah digunakan untuk berubah menjadi kaca *in vivo* Bos taurus yang diturunkan dan embrio Bos indicus dengan hasil sangat memuaskan (Seidel dan Walker 2006; Pryor *et al.*, 2007).

Sebuah sistem vitrifikasi DT efektif untuk embrio kuda juga dikembangkan di ARBL. Embrio kuda vitrifikasi yang diameter<300µmin menghasilkan tingkat kebuntingan 62% pada hari 16 setelah DT (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). Dengan sistem vitrifikasi yang sama, tingkat kebuntingan 65% dicapai dengan embrio kuda yang dingin dan disimpan di 5 ° C selama 12-19 jam sebelum vitrifikasi (Hudson *et al.*, 2006) Whenfetal calf serum (FCS) dalam medium vitrifikasi, digantikan oleh PVA, lima kebuntingan hasil dari enam transfer, di lapangan, pengalihan 24 embrio vitrifikasi dengan kit komersial di mana PVA menggantikan serum (kit SYNGRO vitrifikasi ® kuda; Bioniche Kesehatan Hewan) menghasilkan 16 kebuntingan (67%; Araujo *et al.*, 2008).. Namun, yang lain telah melaporkan kebuntingan tingkat yang lebih rendah (Barfield *et al.*, 2009).

Perlakuan Trypsin

Impor mandat protokol untuk sebagian besar negara yang menjadi embrio sapi tripsin diperlakukan, seperti yang dijelaskan oleh Stringfellow (1998), dalam rangka mengurangi risiko penularan rhinotracheitis bovine menular (BHV-1). Karena tripsin yang ditentukan untuk mengobati embrio berasal dari hati babi, sepenuhnya sistem sintetis untuk penanganan embrio tidak mungkin pada saat ini. Namun, beberapa alternatif penggunaan tripsin hewan yang diturunkan telah diuraikan. Marley *et al.*, (2008) membandingkan tripsin seperti jamur protease rekombinan (TrypLE TM;

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) untuk babi tripsin hati-diturunkan untuk penghapusan dan / atau inaktivasi BHV-1 dari zona pellucida (ZP) - embrio sapi utuh. Para TM TrypLE tampaknya efektif dalam menghapus BHV-1 dari dalam embrio vivo-berasal, tapi tidak sepenuhnya efektif bila digunakan dengan dalam embrio *in vitro*-berasal. Dalam studi lain, tripsin rekombinan bovine (Trypzean TM; Sigma, St Louis, MO, USA), diproduksi di jagung, terbukti seefektif tripsin hewan yang diturunkan di inactivating BHV-1 berpegang pada ZP dari hewan jenis lembu *in vivo* yang diturunkan dari embrio (Seidel *et al.*, 2007.). Penelitian tersebut juga menggunakan inhibitor tripsin kedelai yang diturunkan (Sigma 93620) untuk menonaktifkan tripsin setelah waktu yang ditentukan pemaparan. Ini merupakan komponen penting masa depan media embrio hewan produk-bebas, karena peraturan saat panggilan untuk menonaktifkan tripsin oleh membilas embrio pada media yang mengandung baik serum atau BSA.

Ringkasan Pada tahun-tahun awal industri ET, media sederhana, seperti PBS, yang sering digunakan untuk koleksi dan memegang embrio. Praktisi ditambahkan baik serum atau BSA untuk media ini. Media lebih kompleks yang dirancang khusus untuk digunakan dalam ET telah tersedia dari beberapa sumber komersial. Meskipun penggunaan serum sebagian besar telah dihentikan, sebagian besar media untuk digunakan dalam prosedur ET masih termasuk BSA dan, dalam beberapa kasus, produk lainnya yang berasal dari hewan. Namun, media sintetik berkhasiat tidak mengandung produk hewan yang diturunkan dari sekarang tersedia secara komersial untuk mengumpulkan, memegang dan cryopreserving embrio sapi.

Ucapan Terima Kasih

Beberapa anggota fakultas dan mahasiswa di ARBL, CSU, memberikan kontribusi yang sangat signifikan untuk pekerjaan ini. Khusus terima kasih kepada George E. Seidel Jr, Zell Brink, Elaine Carnevale, Patrick M. McCue, Edward L. Squires, Josh Walker, Jay Hudson, Wendy D. Eldridge-Panuska dan L. Fernando Campos-Chillon. Kathy Shearer, di fasilitas produksi embrio Bioniche media (Pullman, WA), disusun sebagian besar media yang digunakan dalam studi yang dilakukan di unit, dan di lapangan. Penulis juga berterima kasih kepada praktisi beberapa ET kontribusi data percobaan lapangan, terutama G. Bo, LJ Kennel CR Looney, A. Rushmer, B. Stroud dan J. Webb.

Daftar Pustaka

1. Alkemade, S. J., Palasz, A., and Maplettoft, R. J., inventors. Vetrepharm, Inc., assignee. Composition and method for culturing and freezing cells and tissues. US patent no. 5,102,783. 7 April 1992.
2. Araujo, G. H. M., Rocha, A. N., Burns, S. D., Burns, C. M., and Moya, C. F. (2008). Pregnancy rates after vitrified equine embryo transfers in a commercial embryo transfer establishment in the US (partial results). *Acta Scientifica Vet.* **36**(Suppl. 2), 141. [Abstract]
3. Baltz, J. M. (2001). Osmoregulation and cell volume regulation in the reimplantation embryo. In 'Current Topics in Developmental Biology', vol. 52. (Ed. G. P. Schatten.) pp. 56–97. (Academic Press: San Diego.)
4. Banwell, K. M., Lane, M., Russell, D. L., Kind, K. L., and Thompson, J. G. (2007). Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. *Hum. Reprod.* **22**, 2768–2775. doi:10.1093/HUMREP/DEM203
5. Barfield, J. P., Sanchez, R., Squires, E. L., and Seidel, G. E., Jr (2009). Vitrification and conventional cryopreservation of equine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**, 130. [Abstract] doi:10.1071/RDV21N1AB60
6. Block, J., Bonilla, L., and Hansen, P. J. (2009). Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology* **71**, 1063–1071. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.11.007

7. Campos-Chillón, L. F., Walker, D. J., de la Torre-Sanchez, J. F., and Seidel, G. E., Jr (2006). *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology* **65**, 1200–1214. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.07.015
8. Chapman, P. L., and Seidel, G. E., Jr (2008). Experimental design, power and sample size for animal reproduction experiments. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**, 33–44. doi:10.1071/RD07183
9. Darrow M. D. (2001). Developments in freezing and thawing protocols for biopsied *in vivo* embryos. In 'Proceedings of the AETA/CETA Conference'. pp. 1–10. (The American Embryo Transfer Association: Champaign, IL.)
10. Eldridge-Panuska, W. D., Caracciolo di Brienza, V., Seidel, G. E., Jr, Squires, E. L., and Carnevale, E. M. (2005). Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology* **63**, 1308–1319. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.06.015
11. Farin, P. W., Crosier, A. E., and Farin, C. E. (2001). Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* **55**, 151–170. doi:10.1016/S0093-691X(00)00452-0
12. Furnus, C. C., de Mantos, D. G., and Martinez, A. G. (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
13. Gaber, M. H. (2005). Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 203–206. doi:10.1263/JBB.100.203
14. Gardner, D. K. (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**, 9–18. doi:10.1071/RD07160
15. Gardner, D. K., Rodriguez-Martinez, H., and Lane, M. (1999). Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod.* **14**, 2575–2580. doi:10.1093/HUMREP/14.10.2575
16. Givens, M. D., and Marley, S. D. (2008). Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology* **69**, 129–136. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.09.009
17. Hasler, J. F. (2000). *In vitro* culture of bovine embryos in Menezos's B2 medium with and without co-culture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **60–61**, 81–91. doi:10.1016/S0378-4320(00)00086-5
18. Hasler, J. F., McCauley, A. D., Lathrop, W. F., and Foote, R. H. (1987). Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* **27**, 139–168. doi:10.1016/0093-691X(87)90075-6
19. Hudson, J. J., Hudson, B. D., Bailey, J. W., Williams, S., Seagle, C., and Meredith, T. B. (2006). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) in vitrification of equine embryos. *Theriogenology* **66**, 664. [Abstract]
20. Ishimori, H., Saeki, K., Inai, M., Itasaka, J., Miki, Y., Nozaki, N., Seike, N., and Itasaka, J. (1993). Direct transfer of vitrified bovine embryos. *Theriogenology* **39**, 238. [Abstract] doi:10.1016/0093-691X(93)90093-K
21. Kane, M. T. (1974). The effects of pH on culture of one-cell rabbit ova to blastocysts in bicarbonate-buffered medium. *J. Reprod. Fertil.* **38**, 477–480. doi:10.1530/JRF.0.0380477
22. Lane, M., and Bavister, B. D. (1999). Regulation of intracellular pH in bovine oocytes and cleavage stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **54**, 396–401. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199912)54:4<396::AIDMRD10>3.0.CO;2-6
23. Lane, M., Maybach, J. M., Hooper, K., Hasler, J. F., and Gardner, D. K. (2003). Cryosurvival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol. Reprod. Dev.* **64**, 70–78. doi:10.1002/MRD.10210
24. Lee, C. N., and Ax, R. L. (1984). Concentration and composition of glycoaminoglycans in the female reproductive tract. *J. Dairy Sci.* **67**, 2006–2009.
25. Leibo, S. P., and Mapletoft, R. J. (1998). Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. In 'Proceedings of the 17th Annual Convention of the American Embryo Transfer Association (AETA), October, San Antonio, TX'. pp. 91–98. (The American Embryo Transfer Association: Champaign, IL.)
26. Li, J., and Foote, R. H. (1996). Differential sensitivity of one-cell and two-cell rabbit embryos to sodium chloride and total osmolarity during culture into blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* **108**, 307–312. doi:10.1530/JRF.0.1080307
27. Liu, Z., and Foote, R. H. (1996). Sodium chloride, osmolyte and osmolarity effects on blastocysts formation in bovine embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF) and cultured in simple serum-free media. *J. Assist. Reprod. Genet.* **13**, 562–568. doi:10.1007/BF02066609

28. Marley, M. S. D., Givens, M. D., Galik, P. K., Riddell, K. P., Looney, C. R., and Stringfellow, D. A. (2008). Efficacy of a recombinant trypsin product against bovine herpesvirus 1 associated with *in vivo* and *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology* **69**, 746–757. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.10.026
29. Oliver, S. A., and Ellington, J. E., inventors. Advanced Reproductive Technologies, Inc., assignee. Use of arabinogalactin in cell cryopreservation media. US patent no. 5,897,987. 27 April 1999.
30. Palasz, A., Alkemade, S., and Mapletoft, R. J. (1993). The use of sodium hyaluronate in freezing media for bovine and murine embryos. *Cryobiology* **30**, 172–178. doi:10.1006/CRYO.1993.1016
31. Palasz, A. T., Thundathil, J., De La Fuente, J., and Mapletoft, R. J. (2000). Effect of reduced concentrations of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. *Cryobiology* **41**, 35–42. doi:10.1006/CRYO.2000.2262
32. Palasz, A. T., Beltrán Breña, P., De la Fuente, J., and Gutiérrez- Adén, A. (2008a). The effect of different zwitterionic buffers and PBS used for out-of-incubator procedures during standard *in vitro* embryo production on development, morphology, and gene expression of bovine embryos. *Theriogenology* **70**, 1461–1470. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.06.092
33. Palasz, A. T., Beltrán Breña, P., Martinez, M. F., Perez-Garnelo, S. S., Ramirez, M.A., Gutiérrez-Adén, A., and De la Fuente, J. (2008b). Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote* **16**, 39–47. doi:10.1017/S0967199407004467
34. Pryor, J. H., Looney, C. R., Walker, D., Seidel, G. E., Jr, Hasler, J. F., Kraemer, D. C., and Romo, S. (2007). Comparison between conventional direct transfer freezing and vitrification for the cryopreservation of *in vivo* embryos from Brahman cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 224. [Abstract] doi:10.1071/RDV19N1AB215
35. Rall, W. F., and Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196°C by vitrification. *Nature* **313**, 573–575. doi:10.1038/313573A0
36. Seidel, G. E., Jr (1981). Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science* **211**, 351–358. doi:10.1126/SCIENCE.7194504
37. Seidel, G. E., Jr, and Walker, D. J. (2006). Pregnancy rates with embryos vitrified in 0.25-mL straws. *J. Reprod. Dev.* **52**(Suppl.), S71–S76.
38. Seidel, G. E., Jr, Turk, M. L., Gordy, P.W., and Bowen, R. A. (2007). Recombinant trypsin made in maize inactivates bovine herpesvirus-1 adsorbed to the bovine zona pellucida. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 236. [Abstract] doi:10.1071/RDV19N1AB240
39. Steeves, C. L., Hammer, M.-A., Walker, G. B., Rae, D., Stewart, N. A., and Baltz, J. M. (2003). The glycine neurotransmitter transporter GLYT1 is an organic osmolyte transporter regulating cell volume in cleavage-stage embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 13 982–13 987. doi:10.1073/PNAS.2334537100
40. Stringfellow, D. A. (1998). Recommendations for the sanitary handling of *in-vivo*-derived embryos. In ‘Manual for the International Embryo Transfer Society’, 3rd edn. (Eds D. A. Stringfellow and S. M. Seidel.) pp. 79–84. (IETS: Savoy, IL.)
41. Sung, L.-Y., Du, F., Xu, J., Chang, W., Nedambale, T. L., Zhang, J., Jiang, S., Tian, X. C., and Yang, X. (2004). The differential requirements of albumin and sodium citrate on the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod. Nutr. Dev.* **44**, 551–564. doi:10.1051/RND:2004061
42. Tervit, H. R., Whittingham, D. G., and Rowson, L. E. (1972). Successful culture *in vitro* of sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* **30**, 493–497. doi:10.1530/JRF.0.0300493
43. Thibier, M. (2008). Data retrieval committee statistics of embryo transfer: year 2007. *Embryo Transfer Newsletter* **26**, 4–9. Thompson, J. G. (2000). *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos: a decade of achievement. *Anim. Reprod. Sci.* **60–61**, 263–275. doi:10.1016/S0378-4320(00)00096-8
44. Thompson, J. G., Gardner, D. L., Pugh, P. A., McMillan, W. H., and Tervit, H. R. (1995). Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biol. Reprod.* **53**, 1385–1391. doi:10.1095/BIOLREPROD53.6.1385
45. Thompson, J. G., Mitchell, M., and Kind, K. L. (2007). Embryo culture and long-term consequences. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 43–52. doi:10.1071/RD06129
46. Vajta, G., and Nagy, Z. P. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo transfer laboratory? Review on vitrification. *Reprod. Biomed. Online* **12**, 779–796. <http://www.publish.csiro.au/journals/rfd>
47. Van Langendonck, A., Donnay, I., Schuurbiers, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A., and Dessey, F. (1997). Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine

- embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J. Reprod. Fertil.* **109**, 87–93. doi:10.1530/JRF.0.1090087
48. van Wagtenonk-de Leeuw, A. M., den Daas, J. H. G., and Rall, W. F. (1997). Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* **48**, 1071–1084. doi:10.1016/S0093-691X(97)00340-3
49. Voelkel, S. A., and Hu, Y. X. (1992). Direct transfer of frozen–thawed bovine embryos, *Theriogenology* **37**, 23–37. doi:10.1016/0093-691X(92) 90245-M
50. Walker, D. J., and Seidel, G. E., Jr (2006). Vitrification of bovine embryos in medium with polyvinyl alcohol replacing BSA. *Reprod. Fertil. Dev.* **18**, 165. [Abstract] doi:10.1071/RDV18N2AB114
51. Watkins, A. J., Platt, D., Papenbrock, T., Wilkins, A., Eckert, J. J., Kwong, W. Y., Osmond, C., Hanson, M., and Fleming, T. P. (2007). Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 5449–5454. doi:10.1073/PNAS.0610317104
52. Wiemer, K. E., Anderson, A., and Stewart, B. (1998). The importance of water quality for media preparation. *Hum. Reprod.* **13**, 166–172.
53. Wright, J. M. (1981). Non-surgical embryo transfer in cattle: embryo–recipient interactions. *Theriogenology* **15**, 43–56. doi:10.1016/S0093- 691X(81)80017-9
54. Young, L. E., Sinclair, K. D., and Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* **3**, 155–163. doi:10.1530/ ROR.0.0030155

Tingkat Kebuntingan Sapi *Bos Indicus* Laktasi yang Dikenakan Waktu Inseminasi Buatan Tepat Dan Diperlakukan dengan Berbeda Induser Pertumbuhan Folikel

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi efek penggantian EKG dengan FSH atau FSH / LH pada diameter folikel ovulasi (DOF) dan tingkat kehamilan (PR) dari sapi laktasi *Bos indicus* mengalami sinkronisasi protokol ovulasi dan tetap waktu inseminasi buatan (FTAI) berdasarkan progesteron, estradiol benzoate (EB), PGF2 α , dan estradiol cypionate (EC). Pada hari 0, primipara dan multipara Nellore sapi (n = 329) pada 68 hari setelah melahirkan adalah tubuh Kondisi mencetak (BCS) dan menerima implan P4 (PRIMER 1,0 g P4) ditambah 2 mg EB intramuskular (IM). Pada hari ke-8, implan dihapus, dan 250 mg cloprostenol disuntik IM bersama dengan 0,5 mg EC. Pada saat pemindahan implan, hewan dibagi menjadi salah satu dari empat perlakuan: sapi yang diterima (G1) 1 mL larutan garam IM (Control; n = 80); (G2) 300 IU EKG IM (ECG300; n = 84); (G3) 15 mg FSH IM (Folltropin; n = 82); dan (G4) 30 IU FSH / LH IM (Pluset; n = 83); semua sapi yang mengalami FTAI 48-54 jam setelah pengangkatan implan (hari 10). USG transrectal dilakukan untuk mengukur DOF untuk FTAI dan untuk memperkirakan tingkat kehamilan pada hari 35. Sebuah analisis statistik meneliti efek dari pengobatan, teknis, semen, BCS, usia betis dan paritas pada PR ke FTAI. Tidak ada perbedaan yang signifikan dalam PR dan DOF antara kelompok perlakuan (G1, 41,3%, 13,1 mm, G2, 46,4%, 14,5 mm, G3, 46,3%, 14,2 mm, dan G4, 48,2%, 14,3 mm), tapi PR lebih tinggi pada multipara dari pada sapi primipara. Solusi FSH komersial (Pluset atau Folltropin) tidak mempromosikan peningkatan PR atau DOF dari menyusui Nellore sapi dan sama dengan EKG dalam mempromosikan pertumbuhan folikel preovulasi dan mengangkat PR di Nellore sapi dengan BCS moderat mengalami protokol FTAI berbasis progesteron dengan EC.

Kata Kunci: FSH, multipara, Nellore, primipara

Pengantar

Nellore adalah dominan Zebu (*B. indicus*) sapi berkembang biak di Brazil dan merupakan 80% dari semua sapi potong (di atas 100 juta Nellore hewan), dan penggunaannya terus menyebar di Brasil dan negara-negara tropis dan subtropis lainnya (Sartori dan Barros, 2011). Daerah tropis ini ditandai dengan tingkat curah hujan yang tinggi dan suhu tinggi, yang memberikan kondisi yang menguntungkan bagi pertumbuhan pakan dan biaya rendah produksi daging sapi.

Meskipun inseminasi buatan (AI) adalah penting alat untuk meningkatkan keuntungan genetik dan produksi efisiensi ternak besar sapi potong – umum Situasi di Brasil -, kemampuan untuk mendeteksi estrus pada sapi dan menghamili mereka terbatas. Dengan demikian, infrastruktur yang terkait dan staf telah kinerja, yang meningkatkan pertumbuhan folikel terbatas, tetapi dengan hasil yang kontroversial (Santos et al, 2007a, b;.. Sá Filho et al, 2009;.. Martins et al, 2010;.. Penjualan et al, 2011). Waktu paruh FSH dilaporkan pendek (<2 jam) dibandingkan dengan EKG (Fry et al., 1987), dan Mekanisme seluler yang mendasari dimana FSH menginduksi perkembangan folikel dimediasi melalui peningkatan jumlah FSH reseptor pada sel granulosa.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi efek penggantian ecg oleh FSH atau FSH / LH pada diameter folikel ovulasi dan tingkat kehamilan menyusui Nellore sapi mengalami sinkronisasi ovulasi protokol berdasarkan progesteron, EB, PGF2 α , dan EC. Itu hipotesis adalah bahwa FSH atau FSH / LH bisa menggantikan EKG pengobatan protokol FTAI dari Nellore sapi.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilakukan dari bulan November 2008 sampai Januari 2009 pada komersial sapi potong properti di Mato Grosso do Sul Negara, Brasil (kisaran suhu 21-32 ° C). Menyusui Nellore sapi (n = 329, pada rata-rata 68 d postpartum; BCS 2.61 pada skala 1-5, di hari 0) adalah terus dua peternakan di Brachiaria decumbens padang rumput dengan Akses ad libitum air dan mineral suplemen dan dievaluasi dengan ultrasonografi transrectal untuk mengakses Status ovarium mereka. Mereka diperlakukan dengan berikut ini sinkronisasi dasar protokol ovulasi: penyisipan dari 1,0 g progesteron (PRIMER; Tecnopec, São Paulo, Brazil) dalam vagina serta 2,0 mg Estradiol Benzoat (EB) (2,0 mL Estrogen, Farmavet, São Paulo, Brazil) intramuskuler (IM) pada hari 0. Pada hari 8, semua sapi memiliki Menyisipkan PRIMER dihapus dan menerima 0,5 mg Estradiol Cypionate (EC) (0,25 mL ECP, Pfizer Kesehatan Hewan, Brazil) IM dan 12,5 mg PGF2 α (2,5 ml Lutalyse; Pfizer Kesehatan Hewan, Brazil) IM. Segera setelah PRIMER tersebut penarikan, sapi secara acak untuk menerima satu perawatan berikut: (G1) 2 mL larutan garam IM (Kontrol, n = 80); (G2) 300 IU ecg IM (n = 84); (G3) 15 mg FSH (Folltropin-V, Bioniche Kesehatan Hewan, Belleville, Ontario, Kanada; FSH: LH proporsi > 80,0%) IM (n = 82); (G4) 30 IU FSH / LH (0,5 mL Pluset; Hertape - Calier, São Paulo, Brasil; FSH / LH proporsi sekitar 50,0%) IM (n = 83). Pada hari ke-10 (48-54 jam setelah CIDR penarikan), semua sapi yang diterima FTAI. sapi-sapi diinseminasi oleh salah satu dari dua teknisi berpengalaman dengan semen beku-dicairkan dipilih secara acak dari salah satu tiga indukan donor sebelumnya dievaluasi.

Diameter folikel terbesar ditentukan pada hari FTAI dengan rata-rata panjang dan lebar pengukuran dari ultrasonografi transrectal ovarium dengan Scanner Falcon 100 dengan probe linear (8,0 MHZ). kebuntingan didiagnosis 35 hari setelah FTAI menggunakan transrectal USG. Tingkat kehamilan dihitung dengan membagi jumlah sapi hamil dengan jumlah sapi diobati.

Air mani morfologi dan motilitas dievaluasi (Barth dan Oko, 1989) dan disetujui dengan minimum parameter (motilitas <30%, jumlah cacat > 30%, semangat ≤ 3) menurut Hewan Colégio Brasileiro de Reprodução (CBRA) panduan (Henry dan Neves, 1998) dan indukan yang didistribusikan secara merata di antara kelompok eksperimen di eksperimen.

Tingkat kehamilan variabel binomial dianalisis menggunakan PROC LOGISTIK dalam program SAS (statistik Analisis Sistem, versi 9.2). Variabel penjelas tersebut sebagai pengobatan, BCS pada hari ke 0, paritas, hari postpartum, dan pertanian yang digunakan dalam model sebagai kelas. Untuk kehamilan data, model asli juga termasuk efek Sire dan teknisi AI. Untuk semua model regresi logistik, semua interaksi dua arah diuji. Ketika signifikan Efek dari x kovariat pada variabel terikat adalah y terdeteksi, kurva regresi logistik dibuat menggunakan koefisien yang disediakan oleh perangkat lunak dan rumus $y = \text{EXP}(a \times x + b) / [1 + \text{EXP}(a \times x + b)]$.

Data diameter folikel menjadi sasaran analisis varians, dan perbedaan antara sarana diuji menggunakan uji Tukey dengan prosedur PROC GLM dari Program SAS (P < 0,05). Hasilnya disajikan sebagai mean $\pm$ standar deviasi. Beda dengan P < 0,05 adalah dianggap signifikan....

Hasil dan Diskusi

Diameter folikel preovulasi dinilai pada saat FTAI tidak berbeda antara perlakuan (G1, 12.4 $\pm$ 2.97 mm; G2, 14,3 $\pm$ 2.90 mm; G3, 13,8 $\pm$ 2.64 mm; G4, 13,5 mm $\pm$ 3,44, P > 0,05), namun dipengaruhi oleh paritas (multipara, 14.38 $\pm$ 2.70, primipara, 12.19 $\pm$ 3.18; P = 0,003). Tidak ada interaksi antara perlakuan dan paritas ditemukan (P = 0,92). Diameter folikel mempengaruhi probabilitas kehamilan positif, termasuk BCS pada saat penghapusan implan (P < 0,01) (Gambar 1 dan 2).

Menggunakan Folltropin (80% FSH / LH 20%) dan Pluset (50% FSH / LH 50%) dan mengganti ecg dalam protokol FTAI di postpartum, Nellore sapi menunjukkan hasil yang sama untuk diameter folikel preovulasi

dan tingkat kehamilan ($P > 0,05$), meskipun metode ini tidak menunjukkan keuntungan dalam G1 (Tabel 1).

Baruselli et al. (2003) dan Cutaia et al. (2003) melaporkan bahwa 0 atau 400 IU ecg yang diberikan kepada sapi mengalami penghapusan progesteron-perangkat dalam protokol sinkronisasi untuk FTAI. The chorionic gonadotropin kuda pengobatan peningkatan angka kehamilan di Bradford (26,7 vs 34,6%), Nellore (38,9 vs 45,7%) dan persilangannya sapi Nellore (46,8 vs 59,1%). Bergamaschi et al. (2005), memperlakukan sapi dengan protokol yang sama dengan yang Baruselli et al. (2003), juga menunjukkan bahwa meskipun ukuran yang sama dari preovulasi yang folikel, baik ukuran CL dan konsentrasi plasma progesteron setelah estrus meningkat untuk sapi yang menerima 400 IU $\times$ 0 IU ecg. Namun demikian, penting menyebutkan bahwa efektivitas ecg bervariasi dengan tubuh skor kondisi (BCS), jumlah hari postpartum dan asosiasi dengan strategi manajemen lainnya, seperti menyapih sementara (Binelli et al., 2009).

Seperti ecg, penggunaan Pluset atau Folltropin tidak mampu meningkatkan angka kehamilan dan ukuran preovulasi yang folikel pada sapi postpartum Bos indicus dengan moderat Tubuh skor kondisi (BCS rata-rata 2,61 pada skala 1-5). Hasil ini setuju dengan penulis yang menggunakan Folltropin, Tetapi dalam; (Santos et al, 2007 a, b. Martins et al, 2010). kontras dengan orang lain yang digunakan hanya Folltropin (Penjualan et al., 2011; Lima et al., 2010) atau Folltropin dan Pluset (Sá Filho et al., 2009). Dalam penelitian kami BCS di implan memiliki positif efek pada kemungkinan kehamilan ($P < 0,05$) (Gambar 2).

Pada sapi, pengobatan ecg mendorong pertumbuhan folikel di dosis tunggal, yang kemungkinan disebabkan oleh metabolisme panjang paruh (> 50 jam) (Menzer dan Schams, 1979). Sebaliknya, Folltropin-V dan Pluset dilaporkan mengandung 87% dan 50% dari FSH (Mapletoft et al., 1993), masing-masing, dan yang metabolisme tampaknya relatif cepat. setelah intramuskular administrasi, paruh dan hilangnya porcine FSH diperkirakan mencapai 5 jam dan 10-12 jam, masing-masing (Demonstrier et al., 1988). Meskipun folikel lebih tergantung pada LH setelah proses deviasi (Ginther et al., 1996), beberapa peneliti telah menunjukkan adanya reseptor FSH aktif, bahkan folikel dominan (> 10 mm) yang dapat dirangsang oleh injeksi tunggal FSH.

Jumlah LH dalam penyusunan FSH mungkin mempengaruhi dosis FSH diperlukan dalam superovulasi, karena sel-sel granulosa dari folikel yang dominan lebih tergantung-LH, tidak hanya menggunakan FSH pematangan sampai ovulasi (Adams et al., 1992). Salles et al. (2011), yang hanya digunakan Folltropin, menunjukkan bahwa FSH kurang dimurnikan (yang memiliki sejumlah besar LH, seperti Pluset) mungkin juga menghasilkan hasil yang sebanding dengan yang ditemukan di eCGFTAI protokol di sapi potong, yang tidak dikonfirmasi dalam penelitian kami. Efek yang lebih rendah dari pengobatan dengan FSH ditemukan di beberapa penelitian yang digunakan Folltropin atau Pluset mungkin disebabkan oleh Dosis yang digunakan dalam studi ini. Penjualan et al. (2011) dan Sá Filho et al. (2009) menggunakan 10 mg Folltropin dan 25 IU Pluset. Di Penelitian kami menggunakan 15 mg Folltropin dan 30 IU Pluset.

Beberapa penelitian telah menunjukkan efek ecg pada peningkatan angka kehamilan postpartum sapi, dengan efek yang lebih jelas pada orang-orang dengan rendah BCS atau mereka yang anestrous (Baruselli et al., 2004; Sá Filho et al., 2010). Ketika hewan dengan BCS baik, atau dengan cyclicity estrus tengah menjalani pengobatan ecg, itu menunjukkan bahwa ecg tidak mempromosikan peningkatan folikel preovulasi atau tingkat kehamilan (Salles et al., 2011; Pinheiro et al., 2009).

Temuan lain yang menjelaskan hasil kami menganggap pola siklus estrus sapi dalam penelitian kami, di mana 59,8% (197/329) dari hewan menunjukkan CL atau folikel > 10 mm, sedangkan pada penelitian lain (Salles et al, 2011;. Sá Filho et al., 2009) hewan yang digunakan berada di anestrus. Dalam hewan Sá

Filho et al. (2010) dan Baruselli et al. (2003) menunjukkan bahwa ecg lebih efektif dalam mendorong kehamilan di FTAI protokol ketika 400 IU digunakan. Dalam penelitian kami kami digunakan 300 IU ecg.

Diameter folikel preovulasi terpengaruh by order paritas (multipara, 14.38 ± 2.70 , primipara, 12.19 ± 3.18 , $P < 0,05$) serta dengan tingkat kehamilan (multipara 49,3%; primipara, 38,8%); Namun, tidak ada interaksi adalah ditemukan antara paritas dan pengobatan ($P > 0,05$). Pinheiro et al. (2009) menunjukkan peningkatan tingkat kehamilan sapi multipara dibandingkan dengan sapi primipara saat mereka menjadi sasaran protokol FTAI berdasarkan progesteron, sebagaimana yang diamati dalam penelitian ini. Peningkatan permintaan untuk nutrisi pada sapi primipara terkait dengan penghambatan yang efek hisap dapat mempromosikan frekuensi yang lebih rendah dari LH pulsa pada hewan tersebut, yang mengarah ke tingkat kehamilan yang lebih rendah.

Tingkat kehamilan dipengaruhi oleh air mani yang digunakan (bull 1-57,8%, banteng 2-31,8%, banteng 3-45,5% ($P < 0,05$)) dan peternakan ($P < 0,01$) (farm 1-53,9%, pertanian 2-40,3%). Tingkat kehamilan tidak terpengaruh oleh inseminator atau usia betis ($P > 0,05$). Beberapa penulis telah menunjukkan bahwa semen yang digunakan dalam FTAI memiliki dampak besar pada tingkat kehamilan (Sá Filho et al, 2009; Andersson et al, 2004;.. Correa et al, 1997). Seperti yang kita amati dalam penelitian ini, ada perbedaan pada kehamilan tingkat tergantung pada air mani yang digunakan, meskipun fakta bahwa semua memenuhi standar minimum motilitas dan kekuatan, seperti yang disarankan oleh CBRA (Henry dan Neves, 1998). Penelitian masa depan bisa mengidentifikasi variabel yang memprediksi kesuburan semen pada sapi diinseminasi.

Kesimpulan

Solusi komersial hormon follicle-stimulating (Plusnet atau Follitropin) tidak memberikan peningkatan angka kehamilan atau dalam diameter folikel preovulasi postpartum sapi dan sama dengan kuda chorionic gonadotropin dalam mempromosikan pertumbuhan folikel preovulasi dan meningkatkan angka kehamilan di Nellore sapi moderat Rata tubuh-kondisi dikenakan tetap waktu buatan protokol inseminasi menggunakan estradiol cypionate.

Gambar 1 - Pengaruh diameter folikel pada hari 10 pada probabilitas kehamilan di postpartum Nellore sapi mengalami protokol berbasis progesteron FTAI ($P < 0,01$).

Gambar 2 - Pengaruh skor kondisi tubuh pada hari 0 pada probabilitas kehamilan di postpartum Nellore sapi dikenakan protokol berbasis progesteron FTAI ($P < 0,05$).

Tabel 1 - Pengaruh perawatan di penghapusan implan pada diameter folikel di FTI (FD) dan kehamilan rate (PR) pada sapi Nellore sasaran berbasis progesteron tetap waktu protokol inseminasi

Konsentrasi Testosteron Intrafollicular dan Rasio Seks pada Embrio Sapi yang Dikultur Secara Individual

Diterima : 3 Juli 2009

Disetujui : 17 September 2009

Manuel García-Herreros^A, Pablo Bermejo-Álvarez^B, Dimitrios Rizos^B, Alfonso Gutiérrez-Adán^B, Alan G. Fahey^A and Patrick Lonergan^{A,C}

^ASchool Pertanian, Ilmu Pangan dan Kedokteran Hewan, Fakultas Biologi, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Irlandia.

^BDep. Hewan Reproducción Conservación y de Recursos Zoogenéticos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria Alimentaria, Madrid, Spanyol.

^CCorresponding penulis. Email: pat.lonergan @ ucd.ie

Abstrak

Penelitian terbaru telah menunjukkan hubungan antara konsentrasi cairan folikel sapi testosteron dan kemungkinan oosit yang dibuahi oleh spermatozoa X-ORY-bearing, namun teori ini telah ditantang. Untuk lebih menguji hipotesis ini, folikel adalah membedah dari ovarium dari tambun disembelih, terukur dan hati-hati pecah. Kompleks kumulus-oosit (COC) telah dihapus dan cairan folikel dikumpulkan dan konsentrasi testosteron ditentukan oleh radioimmunoassay. COCs telah jatuh tempo, dibuahi dan kultur secara dikenali secara individu; semua embrio dibelah (2 - untuk tahap 4-sel, n = 164) memiliki seks mereka ditentukan oleh PCR. Konsentrasi Testosteron yang positif miring. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara konsentrasi testosteron cairan folikuler pada embrio jantan dan betina (rata-rata $\pm$ sem $51,5 \pm 5,59$ dan $49,5 \pm 7,42$ ngmL⁻¹, masing-masing). Linear, regresi logistik kuadrat dan kubik menunjukkan bahwa konsentrasi testosteron folikel tidak bisa andal memprediksi jenis kelamin embrio dengan rasio kemungkinan 1,001, 1,013, dan 1,066 respectively, dan koefisien determinasi (R²) nilai 0,0003, 0,0126, dan 0,0567 masing-masing. Folikular ukuran dan konsentrasi testosteron tidak terkait (R² = 0,087). Akhirnya, ukuran folikel tidak mempengaruhi penentuan jenis kelamin embrio (P = 0,70). Sebagai kesimpulan, di bawah kondisi penelitian ini, kemungkinan suatu oosit yang dibuahi oleh spermatozoa X-ORY-pembawa tidak dipengaruhi oleh ukuran folikel dari mana ia berasal, atau dengan konsentrasi testosteron dalam cairan folikel.

Pengantar

Ada konflik jelas dalam literatur antara fisiologi reproduksi dan biologi evolusi dalam hal asal-usul perbedaan yang diamati pada rasio jenis kelamin pada saat kelahiran (rasio jenis kelamin yaitu sekunder, SSR) di mammals. Among ahli biologi reproduksi itu secara luas berpikir bahwa jenis kelamin keturunan pada mamalia adalah masalah kesempatan, tergantung on whether oosit yang dibuahi oleh spermatozoa X-ORY-bantalan, sedangkan oosit umumnya dianggap sebagai pasif dalam proses dengan pemupukan yang dianggap sebagai ras antara spermatozoa X-andy-bearing (Zuccotti *et al.*, 2005).. Sebaliknya, ahli biologi evolusi akan menunjukkan bahwa mamalia memiliki kontrol adaptif jenis kelamin keturunan mereka dan akan menunjuk ke RSK atipikal dalam berbagai mamalia sebagai bukti dari konsep (Grant 2007).

Pada sapi, berbagai faktor telah dilaporkan yang mempengaruhi perbandingan jenis kelamin, termasuk (1) waktu inseminasi in vivo (Wehner *et al.*, 1997; Pursley *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2004.), (2) keadaan pematangan dari oosit pada saat inseminasi in

vitro (Gutiérrez-Adán *et al.*, 1996; Dominko dan First 1997; Agung *et al.*, 2006); (3) durasi *coincubation gamet in vitro* (al Kochhar *et al.* 2003.); (4) kondisi budaya *postfertilisation in vitro* (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001) dan bahkan (5) sisi ovulasi (Vázquez *et al.*, 1993; Hylan *et al.*, 2009). Namun, di atas tidak berarti samar-samar dan, khususnya, tidak ada konsensus yang dicapai pada pengaruh waktu inseminasi terhadap rasio jenis kelamin (Rorie *et al.*, 1999; Roelofs *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2008.). Selain itu, tidak satu pun di atas secara konsisten dapat menghasilkan perubahan diprediksi signifikan dalam rasio jenis kelamin dan tanggal teknik yang dapat diandalkan hanya untuk berhasil memilah spermatozoa menurut jenis kelamin adalah penggunaan *cytometry aliran* (Seidel 2009).

Grant (2007) mengemukakan bahwa oosit mungkin kecenderungan menjadi dibuahi oleh spermatozoa X-atau Y-bearing tergantung pada lingkungan folikel dari mana mereka berasal. Telah lebih lanjut mengemukakan bahwa kesuburan rendah diamati dengan jenis kelamin-sperma disortir bisa menjadi hasil dari fenomena ini (Grant dan Chamley 2007). Kami baru saja diuji dan membantah hipotesis ini dengan menyuntikkan oosit *in vitro* dengan X-diurut, Y-disortir, kolam X-dan Y-disortir atau *unsorted air mani* dari banteng yang sama (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008a). Hasil kami sangat menyarankan bahwa perbedaan dalam pengembangan belahan, dan blastokista berikut inseminasi dengan sperma *unsorted* diurutkan versus tidak karena oosit secara istimewa memilih spermatozoa dari satu jenis kelamin terhadap yang lain, tetapi lebih cenderung karena kerusakan sperma yang disebabkan oleh prosedur penyortiran. Selanjutnya bukti eksperimental meyakinkan karena kurangnya seleksi sperma atas nama oosit, setidaknya *in vitro*, disediakan oleh pengamatan *et al.*, Zuccotti. (2005) dan Mao dan Rosenfeld (2009) pada tikus.

Salah satu mekanisme berpotensi mempengaruhi RSK yang telah menerima perhatian dalam beberapa tahun terakhir adalah gagasan bahwa konsentrasi *intrafollicular testosterone* dapat mempengaruhi oosit menjadi dibuahi oleh sperma X-ORY-bearing. Ini telah terkait dengan hipotesis dominasi ibu, yang menunjukkan bahwa betina yang lebih dominan memiliki konsentrasi serum *testosterone* lebih tinggi dan lebih mungkin untuk hamil anak jantan (Grant dan Perancis 2001). Dua makalah khususnya telah dituntut untuk menyediakan bukti untuk mendukung hipotesis ini pada sapi (Grant dan Irwin 2005; Grant *et al.*, 2008.). Pada bagian pertama ini (Grant dan Irwin 2005), oosit telah dipulihkan pada pembantaian dari hewan yang telah disinkronisasikan dan diberikan GnRH untuk mendorong sebuah LH pra-ovulasi surge. The penulis menyimpulkan bahwa konsentrasi *testosterone* berarti dalam folikel bawahan lebih tinggi untuk kemudian jantan embrio daripada embrio selanjutnya betina, sedangkan pada folikel dominan itu lebih rendah. Namun, kesimpulan ini didasarkan pada jumlah yang sangat kecil embrio. Kelompok yang sama kemudian mengulangi percobaan dengan menggunakan oosit berasal dari hewan disembelih *unstimulated* dan melaporkan bahwa konsentrasi *testosterone* secara signifikan lebih tinggi untuk selanjutnya embrio jantan (Grant *et al.*, 2008.). Namun, kesimpulan didasarkan pada proporsi yang relatif rendah embrio dibelah (36%) dan karenanya mungkin *inheren flawed*. We tidak menyadari publikasi lain yang memberikan bukti *substantiable* tentang hubungan antara *Testosterone* dan jenis kelamin embrio. Di sisi lain, menggunakan strategi yang berbeda untuk menjawab pertanyaan yang sama, Díez *et al.*, (2009) melaporkan bahwa penambahan *testosterone*, rentang

konsentrasi, untuk oosit sapi diselenggarakan dalam penangkapan meiosis *in vitro* gagal untuk mengubah rasio jenis kelamin embrio yang dihasilkan setelah IVF.

Mengingat kurangnya konsensus mengenai efek testosteron pada perbandingan jenis kelamin, tujuan dari penelitian ini adalah untuk lebih menguji hipotesis bahwa konsentrasi testosteron intrafollicular dapat mempengaruhi oosit menjadi dibuahi baik oleh seorang spermatozoa-atau bantalan X Y-kromosom.

Bahan dan Metode

Pengumpulan Ovarium dan Penyayatan Folikel

Ovarium pulih dari tambun disembelih di sebuah rumah potong hewan setempat dan dikirim ke laboratorium di fosfat-buffered saline (PBS) dipertahankan pada suhu 37°C. Sebanyak 269 folikel individu (diameter antara 2.5mm dan 12 mm) yang dipotong secara acak dari ovarium hewan yang berbeda. Setiap folliclewas diukur dan hati-hati pecah untuk melepaskan cairan folikel dan kompleks kumulus-oosit (COC). Setelah berada, COC dari setiap folikel terisolasi, dicuci melalui tiga piring PBS dan ditempatkan dalam medium pematangan. Cairan folikuler dari setiap folikel dikumpulkan dan ditempatkan dalam tabung Eppendorf dan dipelihara di atas es. Setelah semua folikel pada hari tertentu telah diproses (biasanya $n = 20$) cairan folikel itu disentrifugasi pada 21 000g selama 1 menit pada suhu kamar dan supernatan itu dikumpulkan dan disimpan pada -80°C untuk analisis.

Pematangan, Fertilisasi, dan Kultur Embrio *In vitro*

COCs kualitas Hanya morfologis baik digunakan. Untuk pematangan, COCs secara individual ditempatkan di sumur kecil (Yah of-the-Nah, WOW) di dasar piring empat Nunc-baik (Nunc, Roskilde, Denmark). Pematangan terjadi di kelompok 20 COCs di drop 100-uL TCM-199 medium (Sigma, Poole, Inggris) ditambah dengan 10% (v / v) serum janin anak sapi (FCS, Sigma) dan 10 pertumbuhan-1 epidermis ngmL Faktor (Sigma) ditutup dengan 800µL minyak mineral pada 39 ° C dalam suasana CO2 5% di udara dengan kelembaban maksimum. Sekitar 22-24 jam kemudian, media maturasi diganti dengan medium pemupukan yang terdiri dari media Tyrode dengan 25mm bikarbonat, 22mMNa-laktat, 1mm Na-piruvat, 6mgmL-1 BSA asam lemak bebas dan 10 mgmL-1 heparin garam natrium (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Setiap dropwas diinseminasi dengan spermatozoa beku-dicairkan banteng Percoll-dipisahkan (GE Healthcare Bio-ilmu, Uppsala, Swedia) pada konsentrasi 1×10^6 spermatozoa mL⁻¹. Gamet adalah co-diinkubasi selama 18-20 jam pada 39 ° C dalam suasana CO2 5% di udara dengan kelembaban maksimum. Zigot Presumtif secara individual gundul dan dipindahkan ke piring WOW baru yang mengandung 80-uL tetes cairan saluran telur sintesis (Sof) dengan FCS 5% di bawah 800µL minyak mineral. Budaya berlangsung di 39 ° C dalam suasana CO2 5%, O2 5% dan 90% N2. Pada 48-60 jam setelah inseminasi embrio dibelah telah dihapus untuk penentuan jenis kelamin. Untuk menghindari bias yang mungkin timbul dari spermatozoa aksesori yang melekat pada zona pelusida, zona itu dihapus dengan inkubasi pada 5mgmL-1 pronase dalam larutan PBS (Sigma) untuk 1-2 menit. Embrio kemudian individual snap dibekukan dalam nitrogen cair sampai analisis.

Analisis Testosteron

Konsentrasi testosteron ditentukan oleh radioimmunassay (RIA) dengan menggunakan kit total 125I-Coat-a-Count testosteron (Siemens Medical Solutions, Malvern, PA, USA). Folikular sampel cairan (diencerkan 1: 50 dengan PBS) diinkubasi dalam tabung dilapisi antibodi-anti-testosteron di hadapan 125Itestosterone pada 37°C selama 3 jam. Para supernatannya tertuang dan radioaktivitas yang tersisa dalam tabung masing-masing dihitung selama 1 menit. Pada 110 pg per tabung, CV antar-dan intra-pengujian adalah 8,4% dan 8,3% masing-masing, sedangkan pada 196 pg per tabung, nilai adalah 5,7% dan 5,6% masing-masing. Sensitivitas pengujian adalah 2 pg per tabung.

Sexing Embrio dengan PCR

Protokol sexing embrio telah dijelaskan sebelumnya (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008b.); singkat, embrio dicerna bermalam di 55°C dengan 8µL per 2 individu - untuk embrio 4-sel solusi 100µgmL-1 proteinase K (Sigma). Setelah pencernaan, proteinaseK was tidak aktif pada 95 ° C for min. Two set 10 primer PCR digunakan untuk menentukan jenis kelamin embrio: chromosomespecific Y primer (BRY1a), dan urutan primer sapi-spesifik satelit (Sat1). Reaksi PCR dilakukan dalam total volume 25µL mengandung 8µL sampel proteinase-K dicerna, 1 IU Gotaq Flexi buffer, 1 IU Gotaq (Promega, Madison, WI, USA), 1.25mM MgCl₂ 0.1mM dNTP, 1 ngµL-1 Bry primer dan 0,2 ngµL-1 Sat primer. PCR dilakukan dengan siklus pertama (94°C selama 3 menit, 60°C selama 40 detik dan 72°C selama 15 detik) diikuti oleh 35 siklus (94°C selama 15 detik, 60°C selama 30 detik dan 72°C selama 15 detik) dan langkah perpanjangan terakhir pada 72 ° C selama 5 menit. Produk divisualisasikan pada% etidium bromida bernoda 2 agarosa gel. Gel dianalisis di bawah pencahayaan ultraviolet untuk band 300-bp positif 1a Bry dan band 216-pb dari urutan satelit. Sampel yang menunjukkan dua band ini digolongkan sebagai jantan, sedangkan sampel hanya menampilkan sebuah band urutan satelit digolongkan sebagai betina. Dari 164 2 - untuk 4 - sel embrio yang diperoleh dalam penelitian ini, 140 berhasil bergender (85,4%). Setiap PCR diolah dengan tiga kontrol: DNA genomik jantan, DNA genom betina dan kontrol negatif.

Analisis Statistik

Semua analisa dilakukan dengan menggunakan SAS (SAS Institut Inc, Cary, NC, USA). Distribusi konsentrasi testosteron dalam cairan folikel adalah positif miring. Dalam rangka untuk menentukan apakah konsentrasi testosteron berbeda antara embrio jantan dan betina, data dianalisis dengan the Wilcoxon menggunakan rank test masuk di ProcNPAR1WAY. Linear, kuadrat dan kubik analisis regresi logistik dengan menggunakan PROC LOGISTIK dilakukan untuk menentukan apakah konsentrasi testosteron dapat digunakan untuk memprediksi jenis kelamin embrio. Rasio odds dan koefisien determinasi (R²) digunakan untuk menentukan kecukupan model regresi logistik. Analisis varian dilakukan berdasarkan kuartil dengan menggunakan PROC GLM. Sampel dibagi menjadi kuartil berdasarkan konsentrasi testosteron folikel, dan analisis dilakukan untuk menentukan apakah ada perbedaan signifikan dalam kadar testosteron dalam kuartil antara embrio kemudian jantan dan betina. Efek tetap dalam model ini adalah kuartil, jenis kelamin dan interaksi jenis kelamin kuartil ×.

Hasil

Dari 269 oosit disampaikan dalam pematangan vitro (di 15 ulangan independen), 164 (61,0%) dibelah berikut IVF. Semua embrio dibelah diolah untuk analisis gender. Data yang akurat tidak memihak pada jenis kelamin yang diperoleh untuk 140 embrio dan semua analisis berikutnya didasarkan pada nomor ini.

Konsentrasi testosteron dalam cairan folikel berkisar 3,7-257,7 ngmL⁻¹ (setara dengan 13-893 nM). Tidak ada hubungan antara diameter folikel dan konsentrasi testosteron intrafollicular (R² = 0,087). Ukuran folikel tidak mempengaruhi jenis kelamin embrio berikutnya (P > 0,05).

Tabel 1. Jumlah embrio sexing, konsentrasi testosteron intrafollicular (deviasi median, mean dan standar) dan P-nilai embrio jantan dan betina (Konsentrasi diberikan pada ngmL⁻¹)

Gender	Number of embryos sexed	Median testosterone concentration (ng mL ⁻¹)	Mean testosterone concentration (ng mL ⁻¹)	Standard deviation (ng mL ⁻¹)
Male	82	32.12	51.50	50.67
Female	58	23.98	49.53	56.55
P-value		0.06	0.22	

Tabel 2. Hubungan antara jenis kelamin jantan atau betina dan testosteron concentration. Logistic analisis regresi (linier, quadratic2 dan cubic3) parameter (penyadapan, testosteron koefisien, odds ratio dan koefisien determinasi (R²))

* P < 0,05; ** P < 0,01

Intercept	Testosterone	Testosterone2	Testosterone3	Odds ratio	R2
0.3105	0.000708			1.001	0.0003
0.0194	0.0134	-0.00006		1.013	0.0126
-0.7426	0.0640**	-0.00067**	0.0000017*	1.066	0.0567

Tidak ada perbedaan yang signifikan antara kadar testosteron cairan folikel untuk kemudian embrio jantan dan betina dengan konsentrasi rata-rata 51,5 dan 49,5 ngmL⁻¹, masing-masing. Ketika konsentrasi testosteron dibagi menjadi kuartil, tidak ada perbedaan dalam frekuensi embrio jantan dan betina dalam masing-masing kuartil (Gbr. 1). Untuk kedua jenis kelamin yang median kurang dari berarti karena distribusi positif miring dari data (Tabel 1). Distribusi konsentrasi testosteron follicular untuk embrio dari setiap jenis kelamin ditunjukkan pada Gambar. 2. Dari embrio yang berasal dari folikel yang lebih dari 300nM testosteron (n=26), 16 adalah embrio jantan dan 10 kemudian betina. Linear, regresi logistik kuadrat dan kubik menunjukkan bahwa kadar testosteron folikel tidak cukup untuk memprediksi embrio jantan dengan rasio kemungkinan 1,001, 1,013, dan 1,066 repectively, and R² nilai 0,0003, 0,0126, dan 0,0567 masing-masing (Tabel 2). Sebuah perbandingan odds 1,001 menunjukkan bahwa untuk setiap kenaikan unit dalam testosteron hanya ada kemungkinan 0,1% dari embrio menjadi jantan. Receiver Operasi (ROC) analisis kurva juga menegaskan bahwa testosteron bukan merupakan prediktor yang memadai embrio jantan (tidak ditampilkan).

Diskusi

Hormon steroid memainkan peran penting selama pematangan meiosis oosit mamalia in vivo dan in vitro. Dalam folikel preovulatory mamalia, the LH surge awalnya merangsang sekresi androgen dan estrogen baik (Dieleman *et al.*, 1983; Osborn dan Moor 1983). Estrogen penurunan konsentrasi ~ 6 jam setelah lonjakan LH, diikuti dengan penurunan androgen dan peningkatan konsentrasi progesteron. Dengan 18 jam setelah lonjakan LH, progesteron merupakan ~ 90% dari kandungan steroid intrafollicular

(Osborn dan Moor 1983). Perubahan pada konsentrasi steroid intrafollicular *in vivo* menunjukkan bahwa keseimbangan yang tepat atau urutan steroid mungkin diperlukan untuk pematangan folikel oosit penuh-tertutup.

Selain itu, COCs mamalia mengeluarkan hormon steroid, termasuk testosteron, selama di pematangan *in vitro* tanpa dukungan dari granulosa folikel atau sel-sel teka dan memiliki pilihan enzim steroidogenik penting (bovine, Schoenfelder *et al.*, 2003;. babi, Dode dan Graves 2002; Shimada *et al.*, 2002).. Selain itu, penambahan testosteron eksogen (100 nM) ke medium maturasi oosit, dipilih berdasarkan konsentrasi fisiologis dilaporkan dalam folikel bovine preovulatory (~ 165 nM, Dieleman *et al.*, 1983) meningkatkan kompetensi perkembangan oosit sapi setelah IVF (Younis *et al.*, 1989;. Silva dan Knight 2000).

Dua makalah baru-baru ini dituntut untuk menyediakan bukti hubungan antara konsentrasi testosteron intrafollicular dan jenis kelamin embrio pada sapi (Grant dan Irwin 2005;. Grant *et al.*, 2008) menyatakan bahwa, tergantung pada konsentrasi testosteron folikel, oosit mungkin kecenderungan menjadi dibuahi oleh spermatozoa-X atau Y-bearing. Pada bagian pertama ini (Grant dan Irwin 2005), oosit telah dipulihkan pada pembantaian dari hewan yang telah disinkronisasikan dan diberikan GnRH untuk mendorong lonjakan LH pra-ovulasi. Para peneliti menyimpulkan bahwa kadar testosteron berarti dalam folikel bawahan lebih tinggi untuk selanjutnya embrio jantan daripada embrio selanjutnya betina, sedangkan pada folikel dominan itu lebih rendah. Namun, kesimpulan ini didasarkan pada jumlah yang sangat kecil embrio (13 jantan ay. 21 betina dan 3 jantan vs 5 betina, dalam folikel dominan dan bawahan, masing-masing). Di kertas kedua (Grant *et al.*, 2008.) oosit berasal dari hewan disembelih unstimulated dan diproses melalui IVF individual. Konsentrasi Testosteron secara signifikan lebih tinggi untuk selanjutnya embrio jantan.

Berbeda dengan kedua studi, dalam studi ini kami tidak menemukan bukti hubungan antara konsentrasi testosteron dalam folikel dari mana oosit diperoleh dan jenis kelamin embrio berikutnya setelah IVF. Kisaran konsentrasi testosteron folikular cairan dalam penelitian kita (13-893 nM) mirip dengan yang dilaporkan oleh Grant *et al.*, (2008) (11-977 nM). Selanjutnya, dalam Grant *et al.*, (2008), embrio yang berasal dari folikel yang lebih dari 300nM testosteron (n = 20), hanya tiga yang kemudian dibuahi oleh spermatozoa X-bearing. Dalam penelitian kami, 26 dari 140 folikel memiliki konsentrasi testosteron lebih besar dari 300 nM, dari, 16 selanjutnya embrio jantan dan 10 kemudian betina.

Alasan kurangnya sesuai antara studi ini tidak jelas, namun ada penjelasan beberapa potensi untuk temuan yang berbeda. Dalam studi Grant *et al.*, (2008) tingkat pembelahan oosit setelah IVF hanya 36% (berbeda dengan 61% dalam penelitian ini), dengan kata lain, hampir dua-pertiga dari oosit gagal untuk membelah dan karena itu dikeluarkan dari analisis data. Hal ini berpotensi telah memperkenalkan bias terhadap data. Mirip dengan Grant *et al.*, (2008), kami mengamati perbedaan besar nilai testosteron rata-rata untuk embrio kemudian jantan dan betina (Gbr. 2); Grant *et al.*, (2008) mengamati bahwa konsentrasi testosteron rata-rata untuk embrio selanjutnya jantan 122,60 nM, dan untuk selanjutnya embrio betina adalah 90,75 nM, sedangkan dalam penelitian kami nilai sebanding adalah 111.36nM dan 83.13nM untuk embrio jantan dan betina, masing-masing. Namun, perbedaan dalam mean konsentrasi testosteron folikular antara embrio jantan dan betina minimal dan tidak berbeda dalam penelitian kita

(Tabel 1; 51,5 49,5 vs ngmL-1, masing-masing). Perbedaan antara nilai median dan rata-rata merupakan cerminan dari fakta bahwa dataware yang sangat miring. Sayangnya, berarti nilai testosteron tidak dilaporkan oleh Grant *et al.*, (2008). Selanjutnya, analisis regresi logistik menunjukkan bahwa konsentrasi testosteron bukan prediktor memadai jenis kelamin embrio berikutnya.

Kami tidak menganalisis cairan folikel dari oosit yang kemudian tidak membelah, untuk dapat membandingkan data kami dengan yang dilaporkan sebelumnya. Namun, untuk mengkonfirmasi bahwa folikel dengan konsentrasi berlebihan peningkatan testosteron tidak berkorelasi dengan mereka oosit yang tidak belah, dalam studi terpisah yang tidak terkait memeriksa efek folikular konsentrasi steroid cairan pada kemampuan oosit untuk mengembangkan ke tahap blastokista (Matoba *et al.*, unpubl data). kami tidak menemukan perbedaan antara konsentrasi testosteron folikel untuk oosit yang kemudian dibelah ($61,1 \text{ ngmL}^{-1}$, $n=154$ folikel) dan mereka yang tidak menggantungkan diri setelah IVF ($67,4 \text{ ngmL}^{-1}$, $n = 43$ folikel).

Kami tidak mengetahui adanya publikasi lain yang perusahaan menyajikan bukti yang mendukung hipotesis bahwa konsentrasi testosteron follicular mempengaruhi kemungkinan fertilisasi oleh spermatozoa X atau Y. Dengan menggunakan pendekatan yang berbeda, Díez *et al.*, (2009) mencegah kembalinya meiosis (yang biasanya terjadi secara spontan pada penghapusan dari folikel) pada oosit sapi belum menghasilkan oleh inkubasi dengan inhibitor kinase cyclin-tergantung, roscovitine, dalam upaya untuk mensimulasikan kondisi intrafollicular mana penangkapan meiosis dipertahankan. Testosteron ditambahkan pada berbagai konsentrasi selama periode penghambatan meiosis dan selanjutnya oosit matang dan dibuahi. Dengan kondisi tersebut, paparan testosteron gagal untuk menimbulkan penyimpangan dalam perbandingan embrio jenis kelamin.

Sebagai kesimpulan, di bawah kondisi penelitian ini, konsentrasi testosteron intrafollicular dari mana oosit matang itu pulih tidak berhubungan dengan jenis kelamin embrio yang dihasilkan berikut pematangan oosit dan fertilisasi *in vitro* dan dengan demikian tidak dapat digunakan untuk menjelaskan perbedaan dalam perbandingan jenis kelamin sekunder . Pada kekuatan bukti yang tersedia, kami yakin kasus hubungan antara konsentrasi testosteron intrafollicular, harus satu ada, masih harus dibuktikan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis berterima kasih kepada Maria Wade dan Niamh Hynes untuk bantuan teknis yang sangat baik dan staf Kepak dan Padang Chilling untuk mendapatkan akses ke jaringan sapi. MGH didanai oleh beasiswa pasca-doktor dari Pemerintah Spanyol (2008-0198).

Daftar Pustaka

1. Agung, B., Otoi,T.,Wongsrikeao, P.,Taniguchi, M., Shimizu, R.,Watari, H., and Nagai, T. (2006). Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of *in vitro*-fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* **52**, 123–127. doi:10.1262/JRD.17055
2. Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., and Gutierrez- Adan, A. (2008a). Can bovine *in vitro*-matured oocytes selectively process X- orY-sorted sperm differentially? *Biol. Reprod.* **79**, 594–597. doi:10.1095/BIOLREPROD.108.070169
3. Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., and Gutierrez- Adan, A. (2008b). Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced *in vitro*. *Physiol. Genomics* **32**, 264–272. doi:10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00234.2007

4. Dieleman, S. J., Kruip, T. A., Fontijne, P., de Jong, W. H., and van der Weyden, G. C. (1983). Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* **97**, 31–42. doi:10.1677/JOE.0.0970031
5. Díez, C., Bermejo-Alvarez, P., Trigal, B., Néstor Caamaño, J., Muñoz, M., Molina, I., Gutiérrez-Adán, A., Carrocera, S., Martín, D., and Gómez, E. (2009). Changes in testosterone or temperature during the *in vitro* oocyte culture do not alter the sex ratio of bovine embryos. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* **311A**, 448–452. doi:10.1002/JEZ.540
6. Dode, M. A., and Graves, C. (2002). Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Theriogenology* **57**, 811–821. doi:10.1016/S0093-691X(01)00700-2
7. Dominko, T., and First, N. L. (1997). Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. *Theriogenology* **47**, 1041–1050. doi:10.1016/S0093-691X(97)00061-7
8. Grant, V. J. (2007). Could maternal testosterone levels govern mammalian sex ratio deviations? *J. Theor. Biol.* **246**, 708–719. doi:10.1016/J.JTBI.2007.02.005
9. Grant, V. J., and France, J. T. (2001). Dominance and testosterone in women. *Biol. Psychol.* **58**, 41–47. doi:10.1016/S0301-0511(01)00100-4
10. Grant, V. J., and Irwin, R. J. (2005). Follicular fluid steroid levels and subsequent sex of bovine embryos. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* **303A**, 1120–1125. doi:10.1002/JEZ.A.233
11. Grant, V. J., and Chamley, L. W. (2007). Sex-sorted sperm and fertility: an alternative view. *Biol. Reprod.* **76**, 184–188. doi:10.1095/BIOLREPROD.106.056259
12. Grant, V. J., Irwin, R. J., Standley, N. T., Shelling, A. N., and Chamley, L. W. (2008). Sex of bovine embryos may be related to mothers' preovulatory follicular testosterone. *Biol. Reprod.* **78**, 812–815. doi:10.1095/BIOLREPROD.107.066050
13. Gutiérrez-Adán, A., Behboodi, E., Andersen, G. B., Medrano, J. F., and Murray, J. D. (1996). Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured *in vitro* versus in the sheep oviduct. *Theriogenology* **46**, 515–525. doi:10.1016/0093-691X(96)00173-2
14. Gutiérrez-Adán, A., Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F. A., Boland, M. P., Pintado, B., and de la Fuente, J. (2001). Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* **55**, 1117–1126. doi:10.1016/S0093-691X(01)00471-X
15. Hylan, D., Giraldo, A. M., Carter, J. A., Gentry, G. T., Jr, Bondioli, K. R., and Godke, R. A. (2009). Sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. *Biol. Reprod.* In press. doi:10.1095/BIOLREPROD.109.077727
16. Kochhar, H. S., Kochhar, K. P., Basrur, P. K., and King, W. A. (2003). Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro*-produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **77**, 33–49. doi:10.1016/S0378-4320(03)00006-X
17. Mao, J., and Rosenfeld, C. S. (2009). Usage of X- and Y-chromosome fluorescent *in situ* hybridization to determine whether the murine oocytes selectively attract one class of spermatozoa over another. *Mol. Reprod. Dev.* **76**, 320. doi:10.1002/MRD.20992
18. Martinez, F., Kaabi, M., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., de Paz, P., and Anel, L. (2004). Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. *Theriogenology* **62**, 1264–1270. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.01.002
19. Osborn, J. C., and Moor, R. M. (1983). The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. *J. Steroid Biochem.* **19**, 133–137.
20. Pursley, J. R., Silcox, R. W., and Wiltbank, M. C. (1998). Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **81**, 2139–2144.
21. Rizos, D., Bermejo-Alvarez, P., Gutierrez-Adan, A., and Lonergan, P. (2008). Effect of duration of oocyte maturation on the kinetics of cleavage, embryo yield and sex ratio in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**, 734–740. doi:10.1071/RD08083
22. Roelofs, J. B., Bouwman, E. B., Pedersen, H. G., Rasmussen, Z. R., Soede, N. M., Thomsen, P. D., and Kemp, B. (2006). Effect of time of artificial insemination on embryo sex ratio in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **93**, 366–371. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.09.004

Dialihbahasakan oleh Cecep Sastrawiludin, S.Pt., Paramedik Veteriner Mahir

22. Rorie, R. W., Lester, T. D., Lindsey, B. R., and McNew, R. W. (1999). Effect of timing of artificial insemination on gender ratio in beef cattle. *Theriogenology* **52**, 1035–1041. doi:10.1016/S0093-691X(99)00192-2
23. Schoenfelder, M., Schams, D., and Einspanier, R. (2003). Steroidogenesis during *in vitro* maturation of bovine cumulus–oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **84**, 291–300. doi:10.1016/S0960-0760(03)00042-6
24. Seidel, G. E., Jr (2009). Sperm sexing technology – the transition to commercial application. An introduction to the symposium “update on sexing mammalian sperm”. *Theriogenology* **71**, 1–3. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.09.015
25. Shimada, M., Kawano, N., and Terada, T. (2002). Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of *in vitro* maturation media. *Reproduction* **124**, 557–564. doi:10.1530/REP.0.1240557 <http://www.publish.csiro.au/journals/rfd>
26. Silva, C. C., and Knight, P. G. (2000). Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* **119**, 261–269.
27. Vázquez, M. I., Molina, A., Mazón, M. S., Brito, J. L., Soto-Camargo, R., and Martínez, R. D. (1993). Determinación del estado reproductivo del ganado bovino sacrificado en tres rastros municipales del estado de Guerrero. *Vet. Méx.* **24**, 155–157.
28. Wehner, G. R., Wood, C., Tague, A., Barker, D., and Hubert, H. (1997). Efficiency of the OVATEC unit for estrus detection and calf sex control in beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* **46**, 27–34. doi:10.1016/S0378-4320(96)01604-1
29. Younis, A. I., Brackett, B. G., and Fayrer-Hosken, R. A. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* **23**, 189–201. doi:10.1002/MRD.1120230206
30. Zuccotti, M., Sebastiano, V., Garagna, S., and Redi, C. A. (2005). Experimental demonstration that mammalian oocytes are not selective towards X- or Y-bearing sperm. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 245–246. doi:10.1002/MRD.20252

Pengaruh hyperacetylation histon terhadap perkembangan praimplantasi embrio sapi sexing jantan dan betina

Diterima : 15 September 2009
Disetujui : 5 February 2010

Clara S. Oliveira^{A,B}, Naiara Z. Saraiva^A, Marcela M. de Souza^A, Tatiane A. D. Tetzner^A, Marina R. de Lima^A and Joaquim M. Garcia^A

^ADepartment of Preventive Veterinary Medicine and Animal Reproduction, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo 14884-900, Brazil.

^BCorresponding author. Email: clarslade@gmail.com

Abstrak

Trichostatin A (TSA) menginduksi hyperacetylation histone oleh deacetylase histon dan akibatnya menghambat ekspresi gen meningkat. Hipotesis adalah bahwa suplementasi TSA selama kultur in vitro (IVC) dari embrio sapi akan meningkatkan tingkat blastosis, khususnya di embrio berkualitas rendah dan betina. Oosit dipupuk secara terpisah dengan spermatozoa X dan Y dan, 70 jam setelah IVF, media IVC dilengkapi dengan 5 nM dan 15 nM TSA untuk 48 atau 144 h. Inkubasi embrio betina dengan 5 nM dan 15 nM TSA mengakibatkan peningkatan serupa di tingkat H3K9 asetilasi histon. Namun, untuk melihat efek yang sebanding pada tingkat H3K9 histone asetat pada embrio jantan, media kultur perlu dilengkapi dengan 15 nM TSA (sebagai lawan 5 nM TSA untuk embrio betina). Perlakuan embrio jantan dan betina dengan 5 nM TSA selama 48 jam atau embrio betina dengan 5 nM for 144 h tidak berpengaruh pada tingkat blastosis, meskipun 15 nM TSA dikompromikan perkembangan embrio. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick akhir label (TUNEL) mengungkapkan apoptosis assay meningkat pada embrio betina diperlakukan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam, serta pada embrio jantan dan betina diperlakukan dengan 15 nM TSA for 48 jam, tapi ini peningkatan apoptosis tidak diamati dalam embrio low quality. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan TSA mempromosikan hyperacetylation histone, tetapi tidak memiliki efek menguntungkan pada produksi in vitro embrio sapi jantan dan betina selama pengembangan praimplantasi.

Pengantar

Meskipun IVF telah didirikan di sapi sejak tahun 1980-an (Brackett *et al.*, 1982), hasil yang diperoleh secara in vitro masih jauh lebih rendah dibandingkan yang diperoleh secara in vivo. Meskipun tingkat pembelahan tinggi untuk oosit sapi matang dan dibuahi in vitro, hanya 25-40% dari zigot berkembang ke tahap blastosis (Lonergan 1994). Selain itu, dalam kultur in vitro (IVC) meningkatkan proporsi embrio jantan, yang berkembang lebih cepat (Avery *et al.*, 1992.) dan mencapai tahap blastosis lebih sering (Xu *et al.*, 1992.).

Selama tahap awal embrio sapi, blastomer menggunakan maternal diwariskan komponen untuk sintesis protein (Lonergan *et al.*, 2003.) dan aktivasi genom embrio hanya terjadi selama transisi dari delapan sampai tahap 16-sel (*et al.*, Badar. 2007). Transisi ibu-zigotik sangat penting untuk aktivasi sejumlah besar gen, sehingga mencapai suatu pola ekspresi gen yang kompatibel dengan perkembangan embrio dan diferensiasi (Schultz 2002).

Tingginya angka kematian embrio diamati setelah IVF di sapi mungkin terkait dengan penangkapan perkembangan selama masa transisi dari siklus sel keempat kelima (Memili dan First 2000) sebagai akibat dari ketidakmampuan embrio untuk

memodifikasi struktur kromatin represif dan untuk mengaktifkan transkripsi gen penting bagi perkembangan (Betts dan King 2001). Selain itu, embrio IVF yang memperoleh transkripsi aktif dapat hadir epigeneticmodifications berubah kromatin (Enright *et al.*, 2003a.) yang menghasilkan profil transkripsi gen yang berbeda antara embrio sapi yang diproduksi in vitro dan in vivo (Wrenzycki *et al.*, 2004). Beberapa gen disajikan pada tingkat yang rendah dalam embrio IVF, seperti transkrip terkait dengan pematangan dan kavitas (Wrenzycki *et al.*, 1996), stres adaptasi (Rizos *et al.*, 2002.), metabolisme embrio (Bertolini *et al.*, 2002.) dan kromosom X inaktivasi (Wrenzycki *et al.*, 2002.). Fungsi-fungsi ini dapat ditingkatkan pada embrio IVF oleh upregulation gen masing-masing. Trichostatin A (TSA) adalah molekul yang mempromosikan peningkatan global dalam ekspresi gen (Johnstone 2002) dan, sehingga, TSA dapat mempengaruhi profil transkripsi gen diekspresikan pada tingkat yang rendah di in vitro-diproduksi (IVP) embrio, meningkatkan ekspresi ini lebih dekat ke tingkat normal gen.

Peningkatan ekspresi gen juga dapat membantu embrio berkualitas rendah, termasuk embrio betina perlahan-lahan berkembang, untuk mengatasi penindasan kromatin dan untuk mencapai pola ekspresi gen yang kompatibel dengan pengembangan lebih lanjut. Renovasi kromatin memainkan peran dalam regulasi ekspresi gen di embrio praimplantasi (Patterton dan Wolffe 1996). Di antara modifikasi epigenetik, asetilasi histon berhubungan dengan ekspresi gen meningkat dengan mengizinkan akses faktor transkripsi untuk (Schubeler *et al.*, 2004.) DNA. Setelah pembuahan, embrio ismethylated genom dan gen disajikan pada tingkat yang sangat rendah (Dean *et al.*, 2001.). Asetilasi histon puncak pada saat aktivasi genom embrio, kompatibel dengan kenaikan keseluruhan tingkat ekspresi gen, sedangkan penurunan tingkat asetilasi terhadap 16 sel dan tahap morula (Maalouf *et al.*, 2008). Asetilasi histon diatur oleh dua enzim utama: (1) asetiltransferase histone menambahkan kelompok asetil ke ekor histone, menetralkan dan melemahkan mengikat untuk nukleosom, dan (2) histone deacetylase (HDAC), yang, sebaliknya, menyingkirkan kelompok asetil dan menyebabkan pematangan kromatin dan membungkam dari segmen DNA pada situs itu (Johnstone 2002). Studi telah menunjukkan partisipasi HDAC dalam proses asetilasi di blastomer (Ma dan Schultz 2008). TSA reversibel inhibitsHDAC pada konsentrasi nanomolar, bertindak Kelas onmost I dan II HDAC (Zupkovitz *et al.*, 2006.). Oleh karena itu, TSA mempromosikan hyperacetilasi histone, mengarah ke peningkatan global pada ekspresi gen.

Tujuan dari studi ini adalah untuk mengevaluasi dampak TSA pada IVP embrio sapi betina dan jantan. Kami menguji hipotesis bahwa TSA akan meningkatkan tingkat produksi in vitro embrio dengan meningkatkan tingkat asetilasi histon, terutama di embrio betina, yang lebih sensitif terhadap kultur in vitro (IVC; Edwards *et al.*, 2001), dan embrio berkualitas rendah .

Bahan dan metode

Suplemen

Kecuali dinyatakan lain, reagensia dan media kultur dibeli dari Sigma Chemical (St Louis, MO, USA).

Persiapan dan Pemilihan Oosit

Ovarium sapi dikumpulkan di rumah pemotongan lokal dan diproses 2 jam setelah pemotongan. Ovarium dicuci di saline (37°C) dan folikel berukuran 3-8mm dengan diameter yang disedot dengan jarum 18-gauge dipasangkan dengan syringe 20

mL. Cumulus Oosit Kompleks (COCs) menyajikan setidaknya tiga lapisan sel cumulus dan sitoplasma homogen dipilih di bawah mikroskop stereo. COCs dicuci di HEPES-buffer-TCM 199 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) ditambah dengan 10% serum janin sapi (FBS; Cripion, Andradina, Brazil), 16 mgmL^{-1} piruvat natrium dan $83,4 \text{ mgmL}^{-1}$ amikasin (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brazil).

Maturasi In Vitro

Kelompok 15 COCs dialihkan ke drop 100-mL medium yang mengandung sodium bikarbonat-buffered TCM-199 dilengkapi dengan FBS 10%, $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$ FSH (Folltropin; Bioniche Kesehatan Hewan, Belleville, Kanada), 50 mgmL^{-1} gonadotrophin human chorionic (Profasi; Serono, Sao Paulo, Brazil), $1,0 \text{ mgmL}^{-1}$ estradiol, 16 mgmL^{-1} natrium piruvat dan $83,4 \text{ mgmL}^{-1}$ amikasin, ditutupi dengan minyak mineral steril (Dow Corning, Midland, MI, USA) dan diinkubasi selama 24 jam pada $38,5^{\circ}\text{C}$ dalam suasana 5% CO_2 di udara di bawah kelembaban jenuh.

Fertilisasi In Vitro

Setelah IVM, sel-sel kumulus yang sebagian dikeluarkan dari oosit oleh pipetting. Kelompok 25 oosit dicuci dua kali dan dipindahkan ke drop 30 mL piruvat laktat albumin Tyrode's (TALP) medium dengan serum albumin 0,6% sapi (BSA), 10 mgmL^{-1} heparin, 18 penicillamine mM, 10 hypotaurine mM dan 1,8 adrenalin mM dan ditutupi dengan minyak mineral steril. Sedotan beku semen dari banteng yang sama bergender dengan sitometri (Lagoa da Serra, Serta ~ ozinho, Brasil) digunakan. Aliran sperma cytometric sortir berdasarkan perbedaan dalam kandungan DNA adalah metode terbaik untuk pemisahan spermatozoa X dan Y kromosom-bearing, dengan akurasi sekitar 90% (Seidel *et al.*, 1999;. Hamano 2007). Setiap jerami, mengandung sekitar 2 juta spermatozoa, telah disentrifugasi secara terpisah pada gradien 45/90 Percoll terputus selama 7 menit pada 3600G. Pelet itu resuspended di 700 mL medium TALPIVF dan disentrifugasi kembali selama 5 menit pada 520g. Setelah sentrifugasi, 80 mL medium yang mengandung pelet itu dikumpulkan dari bagian bawah tabung dan homogen dalam tabung kerucut. Suspensi akhir itu dibagi di antara lima drop yang mengandung oosit pada konsentrasi akhir sekitar 104 spermatozoa untuk setiap oosit. Pelat diinkubasi pada $38,5^{\circ}\text{C}$ selama 20 jam dalam suasana CO_2 5% di udara di bawah kelembaban jenuh.

Kultur In Vitro

Setelah IVF, zigot yang gundul sel kumulus oleh pipetting kuat sebelum kultur dalam cairan oviducal sintesis (SOF) medium dengan 2,5 FBS% dan 5 mgmL^{-1} BSA di $38,5^{\circ}\text{C}$ dalam CO_2 5% di udara di bawah kelembaban jenuh. Kelompok 15-20 dugaan zigot dikultur dalam drop 100-mL sampai waktu perlakuan dengan TSA. Tingkat pembelahan ditentukan 48 jam setelah IVF, sedangkan pengembangan blastosis dievaluasi 7 hari setelah IVF.

Perlakuan dengan TSA

Embrio dicuci dan dipindahkan pada drop 100 mL medium IVC yang telah disuplementasi dengan 0 (kontrol), 5 dan 15nM TSA 70 jam setelah IVC. Embrio dikultur pada media yang ditambah dengan TSA untuk 48 atau 144 jam. Setelah 48 jam, embrio pada kelompok 0 (kontrol), 5 nM dan 15 nM dipindahkan pada drop IVC tanpa

penambahan TSA, sedangkan embrio dari kelompok 5 nM setelah 144 jam dipindahkan ke drop medium IVC segar yang disuplementasi dengan 5 nM TSA.

Imunositokimia dari H3K9 Asetilasi

Setelah 48 jam perlakuan dengan TSA, embrio difiksasi dalam paraformaldehyde 4% selama 1 jam dan disimpan di 48C di phosphatebuffered saline (PBS) ditambah dengan 3% BSA dan 0,5% Triton X-100 hingga 1 minggu. Tetap embrio diinkubasi dengan larutan blocking (3% BSA dan 0,2% Tween-20 dalam PBS) selama 1 jam pada suhu kamar. Selanjutnya, embrio diinkubasi dengan antibodi primer (antibodi mouse H3K9 anti-asetat (H3K9ac) monoklonal; 1: 100) selama 12 jam pada 48C. Embrio itu kemudian dicuci tiga kali dalam PBS selama 10 menit setiap kali sebelum diinkubasi dengan antibodi sekunder (Cy3-terkonjugasi domba antibodi anti-mouse; 1: 200) selama 2 h. Inti diwarnai dengan 10 mLmL⁻¹ Hoechst 33342 selama 10 menit. Embrio itu kemudian dicuci tiga kali selama 10 menit setiap kali dalam PBS dan diperiksa di bawah mikroskop fluoresensi. Reaksi di mana antibodi primer dihilangkan menjabat sebagai kontrol negatif. Gambar struktur masing-masing yang diambil dengan kamera AxioCam dan disimpan dengan menggunakan perangkat lunak AxioVision 4.7.1 (Carl Zeiss, Jena, Jerman).

Perbedaan tingkat H3K9ac antara kelompok-kelompok diestimasi oleh menghubungkan skor asetilasi untuk setiap embrio, mengelompokkan derajat reaktivitas sel sebagai G0 baik, GI, dan GII GIII berdasarkan intensitas respon H3K9ac. Nilai asetilasi akhir untuk setiap embrio dihitung sebagai $(1 \times n_{GI} + 2 \times n_{GII} + 3 \times n_{GIII}) / (n_{G0} + n_{GI} + n_{GII} + n_{GIII})$, dimana n adalah jumlah sel.

Pengujian Apoptosis dan Penentuan Jumlah Total Sel Blastosis

Blastosis dievaluasi oleh terminal pengujian deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoksigenin nick end-labelling (TUNEL) (In Situ Deteksi Cell Death Kit, Fluorescein; Roche Applied Science, Mannheim, Jerman) menurut protokol yang dijelaskan oleh Paula-Lopes dan Hansen (2002). Secara singkat, blastosis paraformaldehyde-tetap diinkubasi dengan 0,5% Triton X-100 dalam PBS untuk 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, embrio dialihkan kepada solusi akhir yang berisi 10 mL larutan enzim (terminal transferase deoxynucleotidyl) dan 90 mL larutan label (fluorescein-dUTP) dan diinkubasi selama 1 jam pada 38.58C, diikuti dengan inkubasi dengan 50 mgmL⁻¹ RNase A untuk 1 jam pada suhu kamar. Inti diwarnai dengan 10 mLmL⁻¹ Hoechst 33342 untuk 10min, setelah blastosis dicuci tiga kali dalam PBS. Sampel kontrol positif diinkubasi dengan 50 IUmL⁻¹ DNase selama 1 jam sebelum inkubasi dengan larutan enzim-dUTP akhir. Sampel kontrol negatif diinkubasi tanpa enzim. Jumlah sel apoptosis dan jumlah inti ditentukan di bawah mikroskop fluoresensi (IX-70, Olympus, Tokyo, Jepang) pada panjang gelombang 330-385 nm (Hoechst 33.342) dan 420-490 nm (fluorescein).

Jumlah rata-rata jenis kelamin-yang spesifik sel dalam blastosis dihitung dengan menggabungkan data dari empat kelompok eksperimental. Embrio yang dinilai sebagai kualitas tinggi jika jumlah sel di atas kualitas rata-rata dan rendah jika jumlah sel di bawah rata-rata.

Analisis Statistik

Perbedaan tingkat blastosis dan apoptosis antara kelompok-kelompok dianalisis dengan uji Chi-squared (X^2) menggunakan software MINITAB, rilis 14.1 (Minitab,

State College, PA, USA). Total jumlah sel dan H3K9ac tingkat dianalisis dengan ANOVA satu arah dan berarti dibandingkan dengan uji Tukey menggunakan GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

Hasil

Awal percobaan yang dilakukan menggunakan semen konvensional (data tidak ditampilkan) menunjukkan bahwa inkubasi dengan konsentrasi TSA lebih tinggi dari 15nM selama 24 jam adalah racun bagi kultur embrio. Hanya konsentrasi 5 nM TSA menghasilkan produksi blastosis dekat tingkat dengan yang diperoleh untuk kultur kontrol bila diterapkan sampai Hari 7 perkembangan (144 jam).

Pengaruh Perlakuan dengan TSA pada Tingkat H3k9ac

Dua ulangan sesuai dengan 58 jantan dan 77 embrio betina pada Hari 5 pengembangan dan mengandung antara 10 dan 32 sel ($n=18-33$ per kelompok eksperimen) dianalisis. Setelah 48 jam perlakuan dengan TSA, tingkat H3K9ac dalam embrio betina diperlakukan dengan 5 dan 15nM TSA lebih tinggi dari mereka yang berada di kelompok kontrol ($P<0.05$) dan tidak ada perbedaan yang signifikan dalam tingkat H3K9ac antara kelompok perlakuan dengan 5 dan 15nM TSA ($P>0.05$). Untuk embrio jantan, perawatan TSA H3K9ac mengakibatkan tingkat lebih tinggi ($P<0.05$) yang tergantung konsentrasi, dengan tingkat H3K9ac lebih tinggi di embrio perlakuan dengan 15nM TSA daripada embrio perlakuan dengan 5 nM ($P=0.05$). Tidak ada perbedaan yang signifikan diamati pada tingkat H3K9ac antara embrio jantan dan betina diperlakukan dengan konsentrasi yang sama TSA ($P>0.05$; Gambar 1.).

Pengaruh Hyperacetylasasi Histon terhadap Perkembangan Embrio Jantan dan Betina

Dalam penelitian ini, 579 embrio sexing jantan dan 419 embrio sexing betina diperoleh di tujuh ulangan ($n=90-155$ embrio dibelah per kelompok eksperimen) dianalisis. Tak satu pun dari konsentrasi TSA diuji meningkatkan tingkat blastosis (Tabel 1). Pada 15nM, TSA berkurang ($P<0.05$) produksi blastosis di kedua embrio jantan dan betina ($P<0.05$).

Embrio jantan ditemukan lebih sensitif terhadap perlakuan berkepanjangan dengan TSA. Misalnya, perlakuan embrio jantan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam mengurangi tingkat blastosis ($P<0.05$), sedangkan penurunan serupa di tingkat blastosis untuk embrio betina tidak terlihat, dengan tingkat blastosis di 5 nM TSA 144 jam yang diberlakukan sama pada embrio sexing betina di kelompok kontrol (Tabel 1; $P<0.05$).

Tabel 1. Pengaruh suplementasi dalam medium kultur dengan Trichostatin A pada perkembangan embrio sapi jantan dan betina

Persentase blastosis dihitung sebagai proporsi dari jumlah embrio yang membelah. Nilai dalam baris dan kolom dengan huruf superscript berbeda berbeda secara signifikan ($P<0.05$). TSA, Trichostatin A

	Male embryos		Female embryos	
	No. cleaved embryos (%)	No. blastocysts (%)	No. cleaved embryos (%)	No. blastocysts (%)
0 (control)	155 (88.57)	66 (42.58) ^a	111 (86.71)	51 (45.95) ^a
5 nMTSA for 48 h	142 (87.11)	60 (42.25) ^{ab}	105 (81.39)	43 (40.95) ^{abc}
15nMTSA for 48 h	135 (78.48)	39 (28.89) ^c	90 (70.86)	25 (27.78) ^c
5 nMTSA for 144 h	147 (83.05)	46	113 (86.92)	38 (33.63) ^{abc}

(31.29)bc

Pengaruh Hyperacetylasasi Histon pada Jumlah Sel dan Apoptosis pada Embrio Sexing Jantan dan Betina

Dalam penelitian ini, tiga ulangan sesuai dengan 63 embrio sexing jantan dan 49 embrio sexing betina blastosis (n=10-18 per kelompok eksperimen) dianalisis. Persentase yang lebih tinggi sel apoptosis ($P<0.05$) diamati pada embrio betina dibandingkan dengan embrio jantan setelah perlakuan dengan konsentrasi yang sama TSA (Tabel 2). Meskipun demikian, perlakuan dengan 5 nMTSA selama 48 jam tidak berpengaruh terhadap persentase sel apoptosis pada embrio jantan dan betina.

Setelah inkubasi embrio dengan TSA, khususnya 15nM selama 48 jam dan 5 nM untuk 144 jam, peningkatan apoptosis diamati pada embrio betina ($P<0.05$). Perlakuan embrio sexing jantan dengan 15nM TSA selama 48 jam juga mengakibatkan peningkatan apoptosis ($P<0.05$; Tabel 2).

Inkubasi embrio dengan TSA tidak berpengaruh terhadap jumlah sel dalam blastosis jantan atau betina, terlepas dari konsentrasi yang diuji ($P>0.05$; Tabel 2). Jumlah total sel blastosis Hari 7 lebih tinggi pada kelompok kontrol jantan dibandingkan dengan kelompok embrio betina yang perlakuan dengan TSA ($P<0.05$).

Jumlah sel rata-rata total untuk semua perawatan untuk embrio sexing jantan dan sexing betina masing-masing adalah 90,53 dan 62,01. Analisis apoptosis pada embrio berkualitas tinggi (yaitu dengan jumlah sel di atas rata-rata; 29 embrio sexing jantan dan 25 embrio sexing betina; n=5-10 per kelompok eksperimental) menunjukkan persentase yang sama sel apoptosis pada kelompok kontrol ($P>0.05$). Apoptosis meningkat secara signifikan ($P<0.05$) setelah perlakuan embrio sexing jantan dan betina dengan 15nM TSA selama 48 jam, serta setelah perlakuan embrio betina dengan 5 nM TSA untuk 144 jam. Namun, evaluasi embrio berkualitas rendah (yaitu mereka yang dengan jumlah sel di bawah rata-rata; 25 embrio sexing jantan dan 27 embrio sexing embrio betina; n=4-9 per kelompok eksperimental) menunjukkan ada perbedaan yang signifikan dalam apoptosis dalam kelompok yang sama-seks setelah perlakuan TSA ($P>0.05$), meskipun ada kecenderungan untuk apoptosis menurun pada kelompok ini.

Tabel 2. Pengaruh suplementasi dalam medium kultur dengan Trichostatin A pada apoptosis pada embrio sapi jantan dan betina

Total jumlah sel diberikan sebagai mean_s.d tersebut. jumlah n=struktur. Nilai dengan huruf superscript huruf yang berbeda dalam baris dan kolom berbeda secara signifikan ($P<0.05$); nilai dalam kolom dengan huruf kecil berbeda superscript berbeda secara signifikan ($P<0.05$). TSA, Trichostatin A

	Male embryos			Female embryos		
	No. blastocysts	Apoptosis rate (%)	Total cell number	No. blastocysts	Apoptosis rate (%)	Total cell number
0 (control)	18	1.49 ^A	96.61±35.60 ^a	13	3.19 ^{BE}	67.38±29.33 ^b
5 nM TSA for 48 h	16	2.05 ^{AE}	94.18±38.54 ^a	13	3.40 ^B	61.00±23.35 ^b
15nMTSA for 48 h	15	3.62 ^{BD}	82.26±36.51 ^a	10	7.56 ^C	58.20±17.47 ^b
5 nMTSA for 144 h	14	1.96 ^A	87.42±22.78 ^a	16	5.33 ^{CD}	60.87±21.10 ^b

Percobaan kedua dilakukan untuk menentukan apakah peningkatan apoptosis diamati pada percobaan pertama yang terkena inner cell mass (ICM) atau trofektoderm (TE) pola apoptosis. Dalam percobaan, jumlah sel dan kejadian apoptosis dinilai secara terpisah untuk ICM dan TE dalam kontrol betina, 15nM 48 jam dan 5 nM 144 kelompok h, serta pengendalian jantan dan 15nM 48 kelompok h (11 jantan dan 19 betina diperluas blastosis; n=4-8 per kelompok eksperimental).

Apoptosis lebih tinggi pada ICM daripada di TE di h 15 nM 48 jantan dan kontrol betina dan 5 nM kelompok 144 jam ($P<0.05$). Pada kelompok embrio jantan dan

betina 15 nM 48 jam, apoptosis pada ICM memiliki jumlah yang lebih tinggi, namun tidak ada perbedaan yang signifikan terdeteksi antara ICM dan TE ($P>0.05$).

Apoptosis dalam ICM mirip dalam kelompok yang sama-seks tanpa perlakuan TSA ($P>0.05$). Dalam TE, apoptosis ini setara dengan yang di kontrol masing-masing untuk embrio jantan diperlakukan dengan 15nM TSA selama 48 jam dan embrio betina diperlakukan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam ($P>0.05$), tetapi meningkat pada embrio betina diperlakukan dengan 15nM TSA selama 48 jam ($P<0.05$).

Apoptosis pada embrio jantan dan betina dalam kelompok kontrol adalah sama untuk sel ICM dan TE ($P>0.05$). Membandingkan embrio jantan dan betina diperlakukan dengan 15nM TSA selama 48 jam, apoptosis lebih besar di TE embrio betina ($P<0.05$), namun tingkat serupa apoptosis terdeteksi dalam ICM ($P>0.05$).

Diskusi

Temuan utama dari penelitian ini adalah bahwa TSA menginduksi hyperacetylation dari H3K9 selama IVC embrio praimplantasi sapi, dan bahwa hal itu meningkatkan apoptosis dan menurunkan tingkat blastosis bila digunakan pada konsentrasi 15 nM.

Penelitian telah menunjukkan bahwa, pada embrio sapi, tingkat asetilasi rendah pada tahap empat sel, tetapi meningkatkan pada tahap eightcell ketika transisi ibu-zigotik terjadi (Yang *et al.*, 2007; Maalouf *et al.*, 2008). Setelah aktivasi genom embrio (EGA), kromatin menjadi transcriptionally aktif (Henery *et al.*, 1995). Dalam konteks ini, penelitian pada tikus menunjukkan pentingnya HDAC1 untuk pembentukan organisasi kromatin (Ma dan Schultz 2008). Siklus pertama replikasi DNA setelah EGA murine sangat penting untuk ekspresi gen endogen maksimum. Dalam hal ini, perlakuan dengan inhibitor HDAC secara signifikan meningkatkan tingkat ekspresi gen (Aoki *et al.*, 1997). Jadi, saat suplementasi TSA dipilih dalam penelitian ini adalah 70 jam setelah IVF, ketika sebagian besar embrio pada tahap delapan sel. Perlakuan untuk 48 jam mengevaluasi efek pada siklus sel keempat dan kelima, sedangkan perlakuan untuk 144 h efek dievaluasi pada siklus sisa perkembangan praimplantasi.

TSA telah berhasil digunakan dalam produksi klon pada sapi untuk meningkatkan efisiensi rekombinasi epigenetik sel dewasa. Dalam kasus ini, TSA dilengkapi pada konsentrasi mulai dari 50nM ke 1 mM pada sel donor inti (Enright *et al.*, 2003b; Wee *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2008) dan embrio segera setelah langkah fusi embrio (Ding *et al.*, 2008; Iager *et al.*, 2008). Dalam penelitian ini, 25 dan 50nM TSA tidak mengizinkan perkembangan embrio yang memadai bila diterapkan untuk waktu yang lebih lama dari 24 jam (data tidak ditampilkan). Sebuah konsentrasi 15nM juga membahayakan perkembangan embrio jantan dan betina. Sebaliknya, perlakuan dengan 5 nM TSA selama 48 jam tidak mempengaruhi perkembangan embrio jantan atau betina, dan perlakuan untuk 144 jam tidak berpengaruh terhadap perkembangan embrio betina. Penelitian pada sel batang embrio telah menunjukkan bahwa sel-sel berdiferensiasi lebih sensitif terhadap efek TSA dibandingkan sel dibedakan (Dai dan Rasmussen 2007). Dalam hal ini, kami mengamati bahwa konsentrasi yang lebih rendah dari TSA harus digunakan untuk perlakuan blastomer untuk memperoleh tingkat tinggi asetilasi tanpa mengorbankan perkembangan embrio.

Kualitas embrio yang dihasilkan secara in vitro dapat disimpulkan secara tidak langsung berdasarkan tarif apoptosis dalam embrio dan jumlah sel. Dalam penelitian ini, tingkat apoptosis yang lebih tinggi dan penurunan jumlah sel diamati pada Hari 7 embrio betina. Penelitian telah menunjukkan bahwa perkembangan embrio betina lebih

lambat (Avery *et al.*, 1992.), bahwa mereka lebih peka terhadap kondisi stres dari IVC (Edwards *et al.*, 2001) dan bahwa mereka memiliki jumlah sel total yang lebih kecil (Xu *et al.*, 1992). Namun, analisis embrio mengandung jumlah sel total atas rata-rata dalam penelitian ini menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan dalam apoptosis antara embrio kontrol betina dan jantan. Dengan demikian, tingkat apoptosis tinggi diamati pada embrio betina mungkin mencerminkan proporsi yang lebih rendah embrio berkualitas tinggi dibandingkan dengan embrio jantan.

Perlakuan dengan TSA menghasilkan peningkatan serupa di apoptosis pada embrio jantan dan betina, yang sekitar 2,4 kali lipat lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol masing masing untuk embrio jantan atau betina saat 15nM TSA digunakan. Pola yang sama terlihat untuk embrio berkualitas tinggi. Namun, perlakuan TSA tidak signifikan mengubah persentase sel apoptosis pada embrio lowquality dan, memang, ada kecenderungan untuk apoptosis menurun pada betina berkualitas rendah dan embrio jantan setelah perlakuan TSA. Peningkatan apoptosis sel-diperlakukan TSA telah dilaporkan oleh Koyama *et al.*, (2000). Dalam penelitian tersebut, efek apoptosis TSA diusulkan menjadi karena hyperacetilasi dari histon karena bentuk santai DNA mudah dikatalisis oleh endonuklease. Apoptosis adalah peristiwa fisiologis perkembangan embrio dan dapat mencegah sel yang rusak dari kontribusi terhadap pembentukan individu, sehingga berfungsi sebagai mekanisme bertahan hidup dalam kondisi stres (Paula-Lopes dan Hansen, 2002). Namun, tingkat apoptosis yang tinggi berhubungan dengan penurunan viabilitas (Jousan *et al.*, 2008.) dan embrio kematian (Antunes *et al.*, 2010).

Menurut Fouladi-Nashta *et al.*, (2005), tingkat apoptosis diantara sel-sel dari ICMare biasanya lebih tinggi daripada sel TE tersebut. Hal ini dikonfirmasi dalam studi ini, di mana apoptosis lebih tinggi antara ICMcells pada semua kelompok eksperimental, dengan pengecualian embrio betina berkultur di hadapan 15 nM TSA selama 48 jam dan embrio kontrol jantan. Dalam kelompok ini apoptosis angka antara sel-sel PTT cenderung lebih tinggi dibandingkan sel TE. Apoptosis TE setara pada kontrol jantan dan embrio TSA yang perlakuan, tapi betina 15 nM embrio TSA-diperlakukan disajikan tingkat apoptosis yang lebih tinggi TE daripada kelompok kontrol. Ada kemungkinan bahwa peningkatan yang diamati dalam embrio betina terkena 15 nM TSA selama 48 jam dapat mengakibatkan kegagalan berikutnya implantasi.

Meskipun perlakuan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam meningkatkan apoptosis embrio betina, TSA tidak mempengaruhi perkembangan embrio dalam kelompok eksperimen. Pada embrio jantan diperlakukan dengan 5 nM TSA untuk 144 jam, tidak ada perubahan dalam apoptosis namun perkembangan blastosis dikompromikan. Secara keseluruhan, hasil menunjukkan bahwa embrio betina lebih sensitif terhadap efek TSA pada hyperacetilasi H3K9 menyebabkan kenaikan tarif apoptosis dari embrio jantan. Namun, ambang batas untuk efek TSA mengakibatkan kematian embrio tampaknya lebih rendah pada jantan daripada embrio betina.

Adalah mungkin bahwa, pada embrio TSA yang perlakuan yang dipamerkan tidak ada efek merugikan pada perkembangan, ada ekspresi gen secara keseluruhan lebih tinggi yang bermanfaat bagi perkembangan pasca-implantasi, terutama dalam hal embrio berkualitas rendah dan betina.

Kesimpulannya, perlakuan TSA meningkatkan H3K9ac, tetapi tidak memiliki efek menguntungkan pada perkembangan praimplantasi embrio sapi jantan atau betina dalam hal parameter dievaluasi dalam studi ini. Satu studi pada tikus melaporkan bahwa

embrio telah somit lebih ketika TSA diberikan kepada betina hamil setelah implantasi embrio (Nervi *et al.*, 2001). Oleh karena itu, studi lebih lanjut diperlukan untuk menyelidiki pola-pola ekspresi gen dan kegiatan perkembangan pasca-implantasi pada embrio perlakuan dengan TSA.

Ucapan Terima Kasih

Penulis berterima kasih kepada Roberta Vantini untuk bantuan teknis di laboratorium IVF. Penelitian ini didukung oleh Lembaga Penelitian Dukungan Negara Sao Paulo (FAPESP).

Daftar Pustaka

1. Antunes,G.,Chaveiro,A., Santos,P.,Marques,A., Jin,H. S., anddaSilva,F.M. (2010). Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reprod. Domest. Anim.* **45**, 26–32. doi:10.1111/J.1439-0531.2008.01131.X
2. Aoki, F., Worrall, D. M., and Schultz, R. M. (1997). Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* **181**, 296–307. doi:10.1006/DBIO.1996.8466
3. Avery, B., Jorgensen, C. B., Madison, V., and Greve, T. (1992). Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **32**, 265–270. doi:10.1002/MRD.1080320312
4. Badr, H., Bongioni, G., Abdoon, A. S. S., Kandil, O., and Puglisi, R. (2007). Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote* **15**, 355–367. doi:10.1017/S0967199407004315
5. Bertolini, M., Beam, S. W., Shim, H., Bertolini, L. R., Moyer, A. L., Famula, T. R., and Anderson, G. B. (2002). Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced Day 7 and 16 bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 318–328. doi:10.1002/MRD. 90015
6. Betts, D. H., and King, W. A. (2001). Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* **55**, 171–191. doi:10.1016/S0093-691X(00) 00453-2
7. Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., and Dressel, M. A. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* **27**, 147–158. doi:10.1095/BIOL REPROD27.1.147
8. Dai, B., and Rasmussen, T. P. (2007). Global epiproteomic signatures distinguish embryonic stem cells from differentiated cells. *Stem Cells* **25**, 2567–2574. doi:10.1634/STEMCELLS.2007-0131
9. Dean,W., Santos, F., Stojkovic, M.,Zakhartchenko,V., Walter, J., Wolf,E., and Reik,W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 13 734–13 738. doi:10.1073/PNAS.241522698
10. Ding, X., Wang, Y., Zhang, D., Wang, Y., Guo, Z., and Zhang, Y. (2008). Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-20-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* **70**, 622–630. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.04.042
11. Edwards, J. L., King, W. A., Kawarsky, S. J., and Ealy, A. D. (2001). Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology* **55**, 209–223. doi:10.1016/S0093-691X(00)00455-6
12. Enright, B. P., Jeong, X. Y., Yang, X., and Tian, X. C. (2003a). Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biol. Reprod.* **69**, 1525–1530. doi:10.1095/BIOLREPROD. 103.019950
13. Enright, B. P., Kubota, C., Yang, X., and Tian, X. C. (2003b). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-20-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* **69**, 896–901. doi:10.1095/BIOLREPROD.103.017954
14. Fouladi-Nashta, A. A., Alberio, R., Kafi, M., Nicholas, B., Campbell, K. H., and Webb, R. (2005). Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod. Biomed. Online* **10**, 497–502.
15. Hamano, K. (2007). Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* **53**, 27–38. doi:10.1262/JRD.18141
16. Henery, C. C., Miranda, M., Wiekowski, M., Wilmut, I., and DePamphilis, M. L. (1995). Repression of gene expression at the beginning of mouse development. *Dev. Biol.* **169**, 448–460. doi:10.1006/DBIO. 1995.1160

17. Iager, A. E., Ragina, N. P., Ross, P. J., Beyhan, Z., Cuniff, K., Rodriguez, R. M., and Cibelli, J. B. (2008). Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells* **10**, 371–380. doi:10.1089/CLO.2007.0002
18. Johnstone, R. W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 287–299. doi:10.1038/NRD772
19. Jousan, F. D., De Castro e Paula, L. A., Brad, A. M., Roth, Z., and Hansen, P. J. (2008). Relationship between Group II caspase activity of bovine preimplantation embryos and capacity for hatching. *J. Reprod. Dev.* **54**, 217–220. doi:10.1262/JRD.19175
20. Koyama, Y., Adachi, M., Sekiya, M., Takekawa, M., and Imai, K. (2000). Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to induction of apoptosis. *Blood* **96**, 1490–1495.
21. Lonergan, P. (1994). Growth of preimplantation bovine embryos. *Acta Vet. Scand.* **35**, 307–320.
22. Lonergan, P., Rizados, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., and Boland, M. P. (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* **38**, 259–267. doi:10.1046/J.1439-0531.2003.00437.X
23. Ma, P., and Schultz, R. M. (2008). Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* **319**, 110–120. doi:10.1016/J.YDBIO.2008.04.011
24. Maalouf, W. E., Alberio, R., and Campbell, K. H. S. (2008). Differential acetylation of histone H4 lysine during development of *in vitro* fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics* **3**, 199–209.
25. Memili, E., and First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* **8**, 87–96. doi:10.1017/S0967199400000861
26. Nervi, C., Borello, U., Fazi, F., Buffa, V., Pelicci, P. G., and Cossu, G. (2001). Inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity. *Cancer Res.* **61**, 1247–1249.
27. Patterson, D., and Wolffe, A. P. (1996). Developmental roles for chromatin and chromosomal structure. *Dev. Biol.* **173**, 2–13. doi:10.1006/DBIO.1996.0002
28. Paula-Lopes, F. F., and Hansen, P. J. (2002). Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 37–42. doi:10.1016/S0006-291X(02)00619-8
29. Rizados, D., Lonergan, P., Boland, M. P., Arroyo-García, R., Pintado, B., de la Fuente, J., and Gutiérrez-Adán, A. (2002). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol. Reprod.* **66**, 589–595. doi:10.1095/BIOLREPROD66.3.589
30. Schübeler, D., MacAlpine, D. M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., et al. (2004). The histone modification pattern of genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263–1271. doi:10.1101/GAD.1198204
31. Schultz, R. M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update* **8**, 323–331. doi:10.1093/HUMUPD/8.4.323
32. Seidel, G. E., Jr, Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D., and Cran, D. G. (1999). Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* **52**, 1407–1420. doi:10.1016/S0093-691X(99) 00226-5
33. Wee, G., Shim, J. J., Koo, D. B., Chae, J. I., and Lee, K. K. (2007). Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction* **134**, 781–787. doi:10.1530/REP-07-0338
34. Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J. W., and Niemann, H. (1996). Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.* **108**, 17–24. doi:10.1530/JRF.0.1080017
35. Wrenzycki, C., Lucas-Hahn, A., Herrmann, D., Lemme, E., Korsawe, K., and Niemann, H. (2002). *In vitro* production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol. Reprod.* **66**, 127–134. doi:10.1095/BIOLREPROD66.1.127
36. Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Korsawe, K., and Niemann, H. (2004). Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim. Reprod. Sci.* **82** [83], 593–603. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.05.009

37. Xu, K. P., Yadav, B. R., King, W. A., and Betteridge, K. J. (1992). Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **31**, 249–252. doi:10.1002/MRD.1080310404
38. Yang, X., Smith, S. L., Tian, X. C., Lewin, H. A., Renard, J. P., and Wakayama, T. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* **39**, 295–302. doi:10.1038/NG1973
39. Zupkovitz, G., Tischler, J., Posch, M., Sadzak, I., Ramsauer, K., *et al.* (2006). Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7913–7928. doi:10.1128/MCB.01220-06