

Fertiliteitsbehandelingen bij het paard: toepassingsmogelijkheden en beperkingen

Artificial reproductive techniques in the horse: applications and limitations

B. Leemans, K. Smits, A. Van Soom, H. Nelis

Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health,
Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

SAMENVATTING

Recente ontwikkelingen in de geassisteerde voortplanting bij het paard laten toe veulens te fokken van sub- of infertiele merries en hengsten, alsook van pasgestorven merries of hengsten. Eicellen kunnen bij levende merries verzameld worden door ovum pick-up (OPU), waarbij de eicellen transvaginaal of transabdominaal uit de follikels gespoeld worden. Post mortem kunnen ook eicellen verkregen worden door de follikels te schrappen. Na rijping kunnen de eicellen bevrucht worden. Dit kan in vivo door eiceltransfer, waarbij een rijpe eicel in de eileider van een geïnsemineerde receptormerrie wordt overgeplant, of in vitro. Aangezien conventionele in-vitrofertilisatie niet succesvol is bij paarden, wordt intracytoplasmatische sperma-injectie (ICSI) toegepast. Na ICSI kunnen de bevruchte eicellen worden overgebracht naar de eileider van een gesynchroniseerde receptormerrie. Eveneens kunnen ze verder in vitro worden opgekweekt tot blastocysten, waarna ze naar de baarmoeder van een receptormerrie overgeplant kunnen worden. In dit artikel wordt de in-vitroproductie van paardenembryo's besproken met de bijhorende voor- en nadelen en de mogelijke klinische en wetenschappelijke toepassingen.

ABSTRACT

Recent developments in the assisted reproduction in horses allow to breed foals from sub- and infertile mares, as well as from recently deceased mares or stallions. Oocytes can be obtained from live donor mares by ovum pick-up (OPU), by flushing oocytes from follicles using a transvaginal or transabdominal approach. Post mortem oocytes can be obtained by scraping the follicles. After oocyte maturation, the oocytes can be fertilized in vitro or can be transferred to the oviduct of an inseminated recipient mare (in vivo). Since conventional in vitro fertilization (IVF) is very unsuccessful in the horse, fertilization is performed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). After ICSI, the fertilized oocytes can be transferred to the oviduct of a synchronized recipient mare or further cultured in vitro up to the blastocyst stage. Subsequently, obtained blastocysts can be transferred to the uterus of a recipient mare. In this article, in vitro embryo production in the horse is highlighted, and possible advantages and disadvantages and clinical and scientific applications are reviewed.

INLEIDING

Heden is de interesse van de paardensector voor geassisteerde voortplantingstechnieken vrij groot. De meest bekende techniek is embryo-transplantatie (ET). Hierbij wordt zeven dagen na de ovulatie en inseminatie een embryo uit de baarmoeder van een genetisch waardevolle merrie gespoeld en overgeplant naar een gesynchroniseerde draagmerrie. Deze techniek laat toe dat waardevolle merries gedurende hun sportcarrière toch nakomelingen kunnen voortbrengen (Vandenberghe et al., 2012). Bij een beperkt aantal merries met welbepaalde vruchtbaarheidsstoornissen kan ET niet worden toegepast. Het gaat hier om merries met eileiderafwijkingen, waarbij hoge embryonale sterfte tussen dag 2 en 4 na ovulatie voorkomt (Ball et al., 1989; Carnevale en Ginther, 1995). Ook merries met litteken-

weefsel ter hoogte van de cervix of merries met chronische endometritis zijn slechte kandidaten voor ET. Om veulens te produceren uit dergelijke merries kunnen eicellen van de merrie verzameld worden met behulp van ovum pick-up (OPU), waarna de bevruchting en de embryonale ontwikkeling buiten deze subfertiele merrie plaatsvinden. Dit kan in vivo door een rijpe donoreicel over te planten naar de eileider van een geïnsemineerde draagmerrie (eiceltransfer) of in vitro door de eicellen te bevruchten met behulp van intracytoplasmatische sperma-injectie (ICSI) en verder in vitro te kweken. Na in-vitro-embryocultuur gedurende negen dagen (IVC) ontstaan blastocysten die naar de baarmoeder van receptormerries getransplanteerd kunnen worden.

Naast de behandeling van subfertiliteit zijn ICSI en eiceltransfer de enige manieren om van een over-

leden merrie nog een veulen te bekomen (Hinrichs, 2010). Bovenstaande technieken zijn eveneens onmisbaar om eicellen en embryo's te bekomen voor de studie van oögenese, fertilisatie, embryo-maternale interacties, het embryometabolisme en stamcelonderzoek.

In dit artikel wordt, twee decennia na de geboorte van het eerste proefbuisveulen (Palmer et al., 1991), overlopen wat de huidige stand van zaken is wat deze geavanceerde vormen van geassisteerde voortplanting bij het paard betreft. Eveneens worden de toepassingsmogelijkheden en beperkingen van OPU, IVF en ICSI in de paardenfokkerij besproken. Tenslotte wordt aangegeven waar de praktijkdierenarts in de nabije toekomst een belangrijke rol kan vervullen.

Historiek van de in-vitroproductie van paarden-embryo's

Sinds de geboorte van de eerste proefbuisbaby, Louise Brown in 1978 (Steptoe en Edwards, 1978), is conventionele in-vitrofertilisatie een gevestigde waarde in de geassisteerde voortplanting bij de mens. Ook bij huisdieren wordt deze techniek met succes toegepast. In 2010 werden in Europa 6% (meer dan 5800) van de kalveren die geboren werden na embryotransplantatie, in vitro geproduceerd, waarvan 1900 in de Benelux, voornamelijk in Nederland (Ponsart, 2010). Ook bij het varken en verscheidene laboratoriumdieren worden tientallen nakomelingen per jaar geboren na in-vitrofertilisatie (Galli et al., 2003a; Betteridge, 2006). Hoewel reeds in 1991 en 1992 de geboorte van drie veulens werd beschreven (Palmer et al., 1991; Bézard et al., 1992), is bij het paard conventionele in-vitrofertilisatie niet herhaalbaar gebleken (Dell'Aquila et al., 1997b). Blijkbaar zijn de spermacellen van het paard niet in staat om in vitro de zona pellucida of de eischaal van de rijpe eicel te penetreren. Dit probleem kan omzeild worden door eicellen van een infertiele merrie te verzamelen, te rijpen en te bevruchten in vivo (eiceltransplantatie- zie infra) of in vitro door toepassing van intracytoplasmatische spermacelinjectie (ICSI). Bij deze techniek wordt de spermacel rechtstreeks in de eicel geïnjecteerd door middel van micromanipulatie. Initieel was het noodzakelijk om, wegens het ontbreken van een efficiënt in-vitrocultuursysteem, de pas geïnjecteerde eicellen onmiddellijk over te planten in de eileider van een draagmerrie (Choi et al., 2004). Dit gaf in de jaren negentig van de vorige eeuw aanleiding tot de geboorte van enkele veulens die wel via ICSI van een in vitro gerijpte eicel waren geproduceerd, maar toch nog voornamelijk in vivo ontwikkelden (Squires et al., 1996; Cochran et al., 1998; McKinnon et al., 2000). Kort daarop werden de eerste ICSI-veulens geboren uit volledig in vitro gekweekte blastocysten (Li et al., 2001; Hinrichs en Choi, 2005; Galli et al., 2007). Het eerste ICSI-veulen in de Benelux, SMICSI, werd geboren in 2009 (Smits et al., 2010).

Het is duidelijk dat de geboorte van gezonde veulens na ICSI mogelijk is. Deze techniek wordt ook al twintig jaar gebruikt voor de behandeling van humane

infertiliteit (Palermo et al., 1992). In dit overzicht wordt besproken op welke wijze eicellen bij zowel dode als levende merries kunnen worden gecollec-teerd, hoe deze eicellen in vitro kunnen worden bevrucht, hoe de technieken werken, hoe deze in praktijk kunnen toegepast worden, wat de taken (bijvoorbeeld eicellogst en eiceltransfer) van de praktijkdierenarts kunnen zijn en welke beperkingen er zijn.

EICELOOGST

Bij levende merries: ovum pick-up (OPU)

Er zijn twee strategieën om eicellen te collecteren bij een levende merrie. Onder echografische begeleiding kunnen transvaginaal alle zichtbare, immature follikels (vanaf circa 5 mm) geaspireerd worden op het ovarium. Vervolgens worden de bekomen onrijpe eicellen in vitro gematureerd. Een tweede methode bestaat erin de preovulatoire dominante follikels (> 35 mm diameter) te aspireren circa 30 uur na stimulatie met hCG of een GnRH-analoog. Deze follikel kan zowel transabdominaal als transvaginaal geaspireerd worden. Hierbij bekomt men meestal één rijpe eicel (metafase II) (Galli et al., 2007; Hinrichs, 2010; Jacobson et al., 2010). In de toekomst zal de eicelcollectie de belangrijkste functie zijn die door de praktijkdierenarts kan worden vervuld.

Collectie van onrijpe eicellen uit antrale follikels

De verzameling van immature eicellen voor in-vitro-embryoproductie gebeurt door middel van echobegeleide transvaginale aspiratie (TVA) van alle zichtbare follikels (minimaal +/- 5 mm) op het ovarium. Vóór de OPU-sessie van start gaat, wordt het paard gesedeerd. Eveneens is het noodzakelijk de darmcontracties zoveel mogelijk uit te schakelen. Bijkomende maatregelen om de merrie te fixeren kunnen ondernomen worden (Meintjes et al., 1995). Na het bandageren van de staart, het ledigen van het rectum, het reinigen van het perineum en het plaatsen van een blaaskatheter wordt de echografische sonde, ingesloten in een steriele plastic houder met een geleidingskanaal voor de punctienaald, tot in de fornix van de vagina gebracht. Verschillende types echotoestellen kunnen worden gebruikt, meestal in combinatie met een sectoriële sonde (7,5 MHz) (Duchamp et al., 1995). Transrectaal wordt een eierstok tegen de kop van de echosonde gefixeerd. Vervolgens wordt de naald (meestal 60 cm; 12-16 gauge) in het geleidingskanaal gebracht. Bij punctie doorkruist de naald initieel het vaginadak waarna via de buikholte onmiddellijk de follikel bereikt wordt. Het is noodzakelijk de follikel in één rechte lijn met de naald te brengen. Bij punctie van deze follikel verschijnt de naald op een gefixeerd punt op het echografiebeeld. Deze naald kan op dit beeld gevolgd worden in de verticale richting vertrekkende van het fixatiepunt. Deze richting komt overeen met het verlengde van het geleidingskanaal. De follikel wordt vervolgens aangeprikt, geaspireerd en afhankelijk van het type naald her-

haaldelijk gespoeld (6 tot 8 keer). Er zijn twee naaldtypes die gebruikt kunnen worden, namelijk een enkelvoudige of een dubbellumennaald. Enkel de naalden met dubbel lumen laten toe tegelijkertijd te aspireren en te spoelen waarbij de kans op eicelcollectie groter is. De spoelvloeistof is gebaseerd op een fosfaatgebufferde zoutoplossing met heparine, kalfsserum en eventueel aangevuld met antibiotica. De naald kan via een roterende beweging de follikelwand afschrappen (curettage-effect). Op deze manier is de kans groter om de eicel te verzamelen (Hinrichs, 2010). Via een vacuümsysteem (200-300 mm Hg) wordt het follikelvocht afgeleid door een transparant, plastic, soepel buizensysteem waarna het vervolgens wordt gefilterd met een embryofilter om de eicel te verkrijgen. Na de OPU-sessie worden er in de regel geen tekenen van ongemak bij de merrie waargenomen. Vaak worden profylactisch antibiotica (penicillinen) en eventueel pijnstillers toegediend. Met behulp van een stereomicroscop (120x) worden de cumulus-eicelcomplexen opgezocht zodat deze verder in vitro kunnen gerijpt worden.

Het verzamelen van immature eicellen is moeilijker doordat de eicellen stevig verbonden zijn met de follikelwand. Bij het rund wordt OPU van immature eicellen sinds de jaren '80 van de vorige eeuw toegepast (Pieterse et al., 1988; Goovaerts et al., 2007). De eicelopbrengst bij het rund is hoog (gemiddeld 60%). Bij de merrie echter is de gemiddelde eicelopbrengst na punctie van antrale follikels slechts 30% (Bruck et al., 1992; Cook et al., 1993; Duchamp et al., 1995; Kanitz et al., 1995), hoewel er percentages gerapporteerd zijn tussen 8% en 84% (Cook et al., 1993). De grote verschillen in eicelopbrengst na OPU zijn immers, net zoals in-vitrocultuur (IVC), zeer sterk "merrieafhankelijk". Drachtige merries kunnen ook dienst doen als eiceldonor (Li et al., 1995) aangezien er tijdens de vroege dracht tot dag 150 -afhankelijk van merrie tot merrie- sporadisch tot regelmatig golven van follikelactiviteit wordt waargenomen (Ginther en Bergfelt, 1992). De eicelopbrengst zou bij drachtige merries hoger liggen dan bij cyclische merries (Li et al., 1995; Cochran et al., 1998).

Ook andere factoren, zoals het moment en de frequentie van de OPU-sessies, de gebruikte techniek en instrumenten en niet in het minst de ervaring van de operator, spelen een rol. Het gebruik van een dubbellumennaald in combinatie met een vacuümpomp kan de eicelopbrengst significant doen stijgen (Cook et al., 1993; Kanitz et al., 1995; Meintjes et al., 1995). Zo rapporteerden Meintjes et al. (1995) eicelopbrengsten uit antrale follikels van 43% tot 58% na flushing via een 18G-dubbellumennaald met een gescheiden flush- en aspiratiekanaal. Bij het rund worden er standaard 2 tot 3 OPU-sessies per week uitgevoerd om de eicelopbrengst in commerciële programma's te maximaliseren (Merton et al., 2003) maar bij de merrie daalt de eicelopbrengst bij wekelijkse OPU-sessies significant (Duchamp et al., 1995). Daarom wordt aangeraden om de merrie om de twee weken te prikken, zodat het tijdsinterval geen nadelige invloed zou hebben op het aantal follikels of aantal gepreleverde eicellen (Hin-

richs, 2010; Jacobson et al., 2010). De eicelopbrengst is groter (52%) bij kleine immature follikels (5 tot 15 mm) dan bij grotere (15-27 mm) follikels (22%) (Kanitz et al., 1995; Goudet et al., 1997; Bøgh et al., 2002). Dit kan verklaard worden door het kleinere oppervlak van kleinere follikels, waardoor de kans om de eicel los te maken tijdens de aspiratie vergroot. De keerzijde van de medaille is dat eicellen afkomstig uit follikels kleiner dan 10 mm een lager in-vitromaturatiepotentieel hebben (Hinrichs, 2010).

Ongeveer 60-90% van de eicellen is na een maturatieperiode van 24 tot 30 uur gerijpt (Bøgh et al., 2002; Colleoni et al., 2009). Bovendien is de ontwikkelingscompetentie lager bij immature eicellen na in-vitromaturatie, dan bij in vivo gematureerde eicellen uit preovulatoire follikels (Hinrichs en Choi, 2005).

Collectie van rijpe eicellen uit preovulatoire follikels

Zoals eerder aangegeven kan de eicel afkomstig van een preovulatoire follikel, al dan niet na hCG-stimulatie, via transvaginale follikelaspiratie verzameld worden. Een alternatief voor deze techniek die, ondanks een verschillende benadering, toch veel gelijkenis vertoont met TVA, is flankpunctie (Figuur 1). Na het inbrengen van een trocar in de flank wordt het ovarium met preovulatoire follikel rectaal tegen de flank gebracht, waarbij de follikel tegen de opening van de trocar wordt gefixeerd. Op deze manier is follikelpunctie door de trocartopening relatief eenvoudig uit te voeren (Hinrichs et al., 1998).



Figuur 1. Ovum pick-up (OPU) van een preovulatoire follikel na hCG-stimulatie via de flank. De eierstok wordt rectaal tegen de buikwand gefixeerd en zo kan de rijpe eicel (metafase II) geaspireerd worden.

Hierbij collecteert men mature of rijpe eicellen die zich al in de metafase II van de meiose bevinden. Dit gaat relatief gemakkelijk omdat de eicellen al klaar zijn om te ovuleren en dus relatief los in de follikel liggen (da Silva, 2008). De eicelopbrengst is 80 %. Indien een eicel wordt aangezogen van een preovulatoire follikel bekomt men maximum één tot twee rijpe eicellen per cyclus (Adams en Bosu, 1988). Superovulatie is bij het paard zeer inefficiënt (Squires et al., 2003; Vandenberghe et al., 2012) en dus wordt er meestal geen extra hormonale stimulatie uitgevoerd. Zelfs indien superovulatie met equine FSH zou kunnen toegepast worden (Squires et al., 2003) is, ondanks de aanwezigheid van meerdere follikels, transvaginale punctie van meerdere preovulatoire follikels moeilijk. Door de grootte van het gesuperovuleerde ovarium is rectale manipulatie zeer moeilijk tot onmogelijk. Eveneens belemmert het vrijgekomen bloed de klaarheid van het echobeeld (MacLellan et al., 2002).

Mature eicellen kunnen onmiddellijk bevrucht worden met ICSI ofwel overgeplant worden in de eileider van een geïnsemineerde receptormerrie (eiceltransfer).

Bij gestorven merries

Wanneer een waardevolle merrie plots sterft of geëuthanaseerd moet worden, kunnen de eicellen uit alle follikels op de eierstokken gecollecteerd worden in een poging om van deze merrie toch nog nakomelingen te kunnen verkrijgen. Het is aangewezen om vóór de euthanasie de eierstokken onder anesthesie te verwijderen. De eierstokken kunnen vervoerd worden naar het laboratorium in een koelbox met bijvoorbeeld zakken infusievloeistof (32 tot 37°C) om de temperatuur constant te houden. Indien het transport langer dan vier uur duurt, is het aangewezen om de eierstokken te vervoeren bij ongeveer 15°C in een Equitainer® (Lena, 1998). De slagingskans daalt gevoelig nadat eierstokken langer dan zes uur getransporteerd moeten worden (Carnevale et al., 2004; Ribeiro et al., 2008). In het labo worden de eicellen verzameld door de follikels op de eierstokken te openen en de binnenwand af te schrapen en nadien te spoelen met TCM199 met heparine (25 IU/ml) (Jacobson et al., 2010) (Figuur 2). Hoewel op die manier per merrie zes tot tien eicellen bekomen worden, hangen de resulta-

ten sterk af van de gezondheidsstatus en de leeftijd van de merrie. Hoe ouder de merrie is, hoe minder follikels en eicellen ze produceert (Jacobson et al., 2010).

Op basis van de cumulusmorfologie worden de cumulus-eicelcomplexen onderverdeeld in cumuluscompacte (immature) en cumulusgeëxpandeerde (mature) eicellen (Cook et al., 1992; Duchamp et al., 1995; Meintjes et al., 1995). De cumulusgeëxpandeerde eicellen worden maximum 24 tot 30 uur gematureerd, terwijl de maturatietijd bij cumuluscompacte complexen minstens 28 tot 36 uur bedraagt (Hinrichs et al., 2002; Hinrichs, 2010).

Hoeveel eicellen er uit een dode en een levende merrie kunnen gecollecteerd worden en hoeveel embryo's en veulens er uit die eicellen kunnen worden geproduceerd en voortgebracht, worden weergegeven in Tabel 1.

EICELTRANSFER

Bij een eiceltransfer wordt een rijpe eicel van een donormerrie overgeplant naar de eileider van een geïnsemineerde receptormerrie. Eicellen kunnen afkomstig zijn van een donormerrie met een preovulatoire follikel (mature eicel), waarbij de eicel onmiddellijk kan worden getransfereerd. Wanneer eicellen afkomstig zijn van immature follikels kunnen de eicellen enkel getransfereerd worden na in-vitromaturatie. Praktisch wordt eerst de preovulatoire follikel van zowel de donormerrie als de receptormerrie gepuncteerd. Vervolgens ondergaat de receptormerrie een chirurgische ingreep waarbij de donoreicel in de eileider wordt gebracht (Figuur 3). Het spreekt vanzelf dat de praktijkdierenarts hierin een belangrijke rol kan spelen. De getransfereerde mature eicel wordt in vivo bevrucht en ontwikkelt verder in de eileider en de baarmoeder van een geïnsemineerde receptormerrie. Met deze techniek kunnen heel wat fertiliteitsstoornissen van de waardevolle donormerrie verholpen worden: het falen van de ovulatie, een obstructie van de eileiders, een persisterende endometritis, littekenweefsel in de cervix, enz. Daarom zijn subfertiele merries die geen levende embryo's kunnen produceren, uitstekende kandidaten voor eiceltransfer. Het eerste veulen geproduceerd via deze techniek, werd geboren in 1980 (McKinnon et al., 1988). Carnevale en Ginther (1995) rapporteerden experimen-

Tabel 1. Gemiddeld aantal eicellen/embryo's/veulens dat gecollecteerd/geproduceerd kan worden uit een dode merrie of een al of niet gonadotropine gestimuleerde follikel van een levende merrie (naar Smits et al., 2012).

Merrie	Levend gestimuleerd	Levend ongestimuleerd	Dood
Aantal onrijpe eicellen	-	3	9
Aantal rijpe eicellen	1	2	6
Aantal blastocysten na ICSI	0,2	0,4	1,2
Aantal veulens	0,14	0,28	0,84
Aantal pogingen nodig om een veulen te bekomen	7	3,6	1,2

Verondersteld maturatiepercentage van 60 %, een blastocystpercentage van 20-41 % uit in vivo gerijpte eicellen na intracytoplasmatische spermacelinjectie (ICSI) en een kans van 70% om een veulen te bekomen na transfer (Carnevale et al., 2003; Hinrichs, 2010; Jacobson et al., 2010).

tele transfers met een hoog succespercentage (92%; 11/12) indien eicellen verkregen werden van jonge donoren en in vitro gematureerd werden voordat ze teruggeplaatst werden in eileiders van geïnsemineerde receptoren. Eiceltransfer kende geen klinische toepassingen tot laat in de jaren '90 van de vorige eeuw (Carnevale et al., 2001; Hinrichs et al., 2000). In 2001 werden nakomelingen verkregen na transfer van eicellen afkomstig van donormerries met fertiliteitspro-

blemen (Carnevale et al., 2005). Aan de Colorado State University werd meer dan tien jaar geleden al een commercieel eiceltransferprogramma opgestart. Tussen 2000 en 2004 werden 86 subfertiele donormerries met een gemiddelde leeftijd van 19 jaar behandeld (Carnevale et al., 2005). Zestien dagen na de transfer werd een drachtigheidspercentage van 40% (201/504) behaald: één op vijf van deze drachten ging nog verloren tegen dag 50 (42/201) na de eiceltransfer. Het succes



Figuur 2. Het verzamelen van eicellen bij gestorven merries. (A) Het follicelvocht wordt uit de follicels geaspireerd (-100 mmHg). (B) De follicelwand wordt met de aspiratiernaald afgeschraapt en tegelijkertijd gespoeld met heparine (25 IU/ml). (C) De eierstok wordt ingesneden om de eicellen in de follicels, die niet aan het oppervlak zichtbaar zijn, ook te kunnen verzamelen na schrapping.



Figuur 3. Eiceltransfer (OT). (A) Na de flankincisie wordt het ovarium in de wonde gebracht. (B) Op dat ogenblik kan de eicel aan de infundibulumzijde in de eileider gebracht worden.

van deze klinische toepassing was niet afhankelijk van het cyclusstadium van de receptormerrie, noch van het type sperma (vers, gekoeld of diepvries) waarmee de merrie werd geïnsemineerd, maar wel van de leeftijd van de merrie. Bij 80% (69/86) van de jongere donormerries kon via deze techniek een veulen verkregen worden. Indien de donormerrie echter ouder was dan 20 jaar daalde dit percentage tot 62%. In vergelijking met de klassieke kunstmatige inseminatie worden geïnsemineerde receptormerries na transfer drachtig met een gelijkaardig drachtigheidspercentage (Carnevale et al., 2005; Hinrichs et al., 2002).

Samengevat is deze techniek zeer efficiënt indien er één mature eicel per merrie geaspireerd wordt. Indien er gekozen wordt om immature follikels te aspireren, doet men beter geen eiceltransfer, maar zijn ICSI en in-vitro cultuur het meest efficiënt (Hinrichs en Choi, 2005).

IN-VITROFERTILISATIE (IVF)

In-vitrofertilisatie, waarbij men in een petriplaatje rijpe eicellen met gecapaciteerd sperma incubiert, is bij de mens, het rund, het varken en enkele laboratoriumdieren de standaardprocedure voor in-vitro-embryo-productie. Hoewel er drie veulens geboren zijn met behulp van in vitro gefertiliseerde eicellen (Palmer et al., 1991; Bézard et al., 1992) is deze techniek bij het paard niet herhaalbaar gebleken en tot nu toe niet in de praktijk toepasbaar (Tabel 2). Het blijkt voor paarsperma onmogelijk om in vitro de zona pellucida van de eicel te penetreren. Na het succesvolle resultaat van Palmer et al. (1991) en Bézard et al. (1992) hebben verschillende onderzoeksgroepen zich de laatste decennia toegelegd op de problematiek van IVF bij het paard (Choi et al., 1994; Dell'Aquila et al., 1997a; Dell'Aquila et al., 1997b; Alm et al., 2001; Hinrichs et al., 2002; Mugnier et al., 2009). De bevruchtingspercentages varieerden van 0% tot 60%, maar deze resultaten bleken niet herhaalbaar, zelfs niet binnen hetzelfde laboratorium (Dell'Aquila et al., 1997a; Dell'Aquila et

al., 1997b; McPartlin et al., 2009). Theoretisch kan het probleem om de eicel te penetreren zich situeren op een drietal niveaus: de sperma-activatie (capacitatie), de eicel (modificatie van de zona pellucida in de eileider) of de in-vitro-omgeving waarin de gameten worden ondergebracht. Recent is geclaimd dat voornamelijk de sperma-activatie gestimuleerd door eileidercondities in gebreke blijft bij IVF (McPartlin et al., 2009). Vers geëjaculeerde spermacellen zijn nog niet in staat om te bevruchten en moeten eerst een rijpingsproces of capacitatie ondergaan. Bovendien moet de spermacel nog bijkomende veranderingen ondergaan om een voldoende voorwaartse kracht te ontwikkelen om bij bevruchting de zona van de eicel te kunnen penetreren (Suarez, 2002). Deze veranderingen worden gedefinieerd als hyperactivatie.

INTRACYTOPLASMATISCHE SPERMA-INJECTIE (ICSI)

ICSI is een vorm van fertilisatie waarbij één spermacel met een micropipet wordt geaspireerd en in het cytoplasma van een mature eicel wordt geïnjecteerd door middel van micromanipulatie. Met deze techniek worden de problemen van conventionele IVF omzeild door rechtstreeks de zonabarrière te overbruggen. De hele procedure wordt uitgevoerd in een druppel medium onder olie met behulp van een omgekeerde microscoop annex micromanipulator. De beweging van de spermacellen wordt afgeremd in een visceus medium met polyvinylpyrrolidone. Een progressief motiele spermacel wordt geaspireerd met een fijne glazen pipet (7-8 µm) en geïmmobiliseerd met een Piezopuls (Smits et al., 2012a). Vervolgens wordt de eicel gefixeerd met een grotere holdingpipet van 15-20 µm. Met behulp van Piezopulsen worden de zona pellucida en de eicelmembraan gebroken en tenslotte wordt de spermacel in het cytoplasma van de eicel geïnjecteerd. De bevruchte eicellen worden gedurende zeven tot negen dagen in vitro verder opgekweekt in een cultuur-

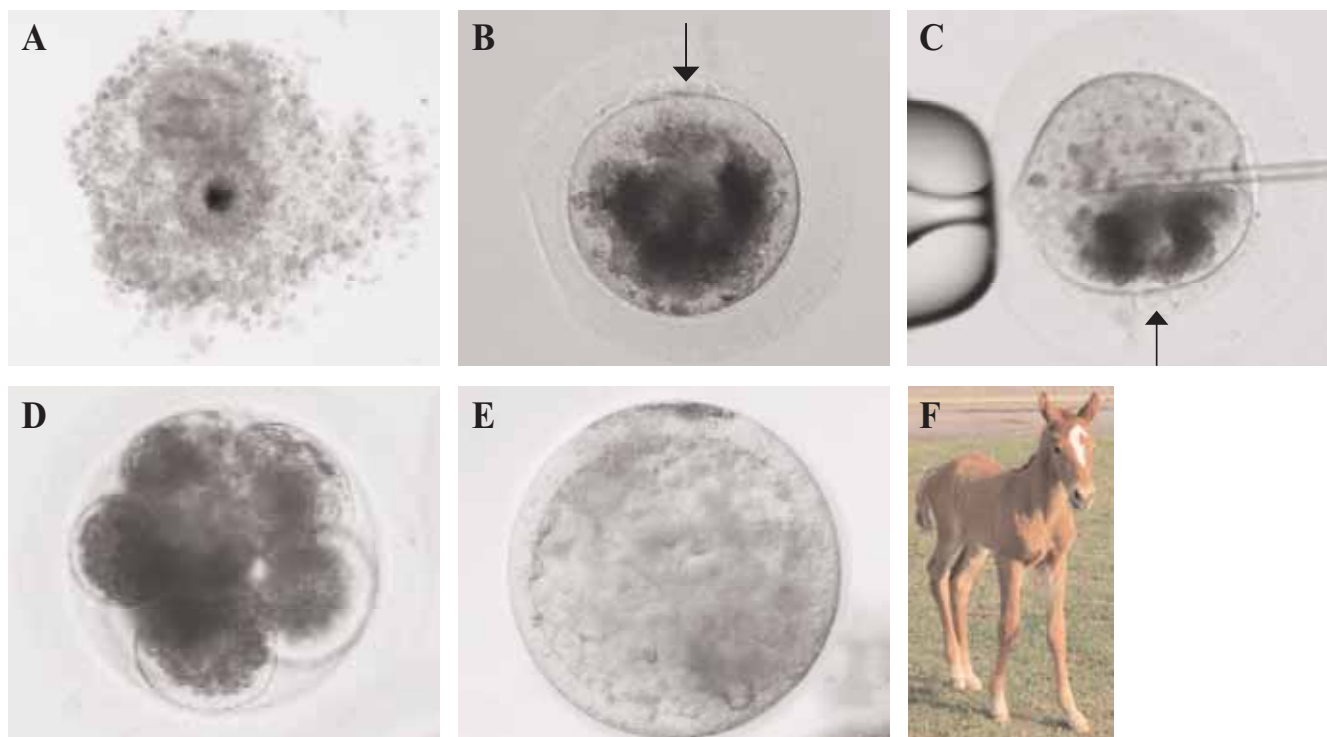
Tabel 2. Overzicht van de resultaten van conventionele in-vitrofertilisatie bij het paard.

Maturatie	N eicellen	Sperma-behandeling	N bevruchte eicellen	N gedeelde eicellen	Referentie
In vivo	113	Ca Ionofoor A23187	16 (14%) ^{a,b}		Palmer et al., 1991
In vivo	173	Ca Ionofoor A23188	30 (17%) ^a	22 (13%) ^b	Bézard et al., 1992
In vitro	57	Caffèïne/Ca Ionofoor A23187	2 (4%)		Choi et al., 1994
In vitro	232	Heparine	41 (18%)	0	Dell'Aquila et al., 1996
In vitro	206	Heparine	18 (9%)	0	Dell'Aquila et al., 1997a
In vitro	203	Heparine	14 (7%)	5 (2%)	Dell'Aquila et al., 1997b
In vitro	349	Heparine/Ca Ionofoor A23187	45 (13%)		Alm et al., 2001
In vitro	815	Ca Ionofoor A23187	38 (5%)		Hinrichs et al., 2002
In vitro	89	PVA/BSA/Brc-AMP/Ionomycine	28 (31%)		Choi et al., 2003
In vitro	385	Heparine/Ca Ionofoor A23187/BSA	26 (7%)		Roasa et al., 2007
In vitro	994	Ca Ionofoor A23187	53 (5%)		Mugnier et al., 2009
In vitro	74	Procaïne	47 (64%) ^c		McPartlin et al., 2009

^a eileidertransfer

^b geboorte van 1 IVF-veulen (Palmer et al., 1991), 2 IVF-veulens (Bézard et al., 1992)

^c som van de bevruchte en gedeelde eicellen



Figuur 4. In-vitro paardeneicellen en -embryo's. (A) eicel omgeven met cumuluscellen; (B) mature eicel na verwijdering van de cumuluscellen. Pijl: poollichaampje; (C) intracytoplasmatische spermacelinjectie in een gerijpte eicel met het poollichaampje op 6 uur (pijl); (D) achtcellig embryo; (E) blastocyst; (F) veulen geboren na ICSI (Smits et al. 2010).

medium met een hoog glucosegehalte, tot het blastocyststadium wordt bereikt (Figuur 4). De bekomen blastocysten kunnen in de baarmoeder van een draagmerrie worden overgepland of eventueel worden ingevroren. De kans op dracht na de transfer van een in vitro geproduceerd embryo is vergelijkbaar met die van in vivo geproduceerde embryo's (70-80%) (Colleoni et al., 2009). Ook na het invriezen en ontdooien van in vitro geproduceerde blastocysten zijn drachtigheidspercentages van 75% beschreven (Choi et al., 2011). Deze resultaten worden echter slechts in enkele laboratoria bereikt (Castex et al., 2011).

VOORDELEN EN TOEPASSINGEN VAN OPU/ICSI/IVC

Bij de merrie

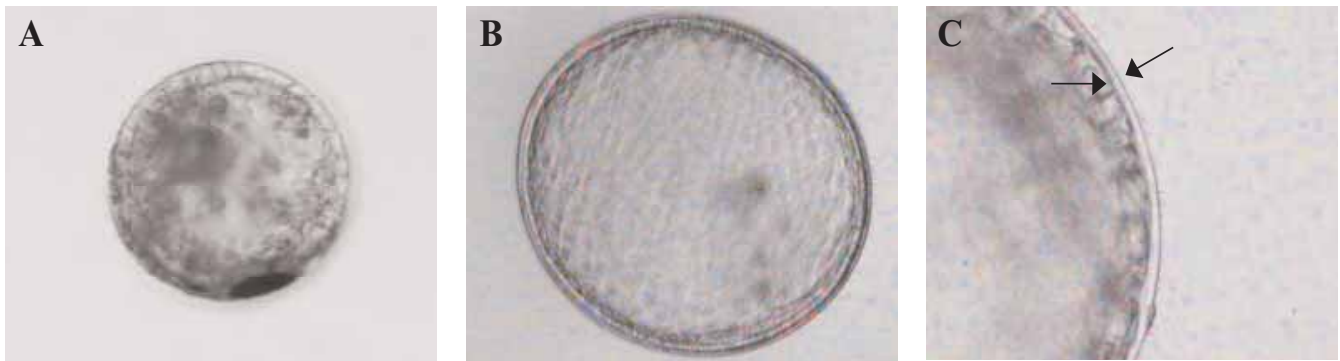
Ovum pickup en ICSI laten toe om eileider-, baarmoeder- (bijvoorbeeld chronisch persisterende endometritis) en cervixproblemen te omzeilen. De prevalentie van eileiderpathologieën, behalve dan van tumorale aandoeningen (Nelis et al., 2012a), is niet bekend bij de merrie. Hoewel moeilijk te diagnosticeren, zijn er afwijkingen aan de eileider beschreven die een normaal eicel- en spermatransport verhinderen (Scott et al., 1995). Ook merries die geen embryo's kunnen voortbrengen door cervixdeformaties en -adhesies en merries met andere afwijkingen te wijten aan veroudering van het voortplantingsstelsel zijn gebaat bij deze techniek. Hoewel met deze techniek anatomische afwijkingen kunnen omzeild worden, kan de daling van de vitaliteit van de eicellen bij

het ouder worden van de merrie niet verbeterd worden (Carnevale, 2008).

Ovulatiestoornissen zouden ongeveer in 8% van de cycli voorkomen (McCue en Squires, 2002). Ovum pick-up biedt ook een oplossing voor deze merries, tenzij een slechte eicelkwaliteit aan de grondslag ligt van de ovulatiestoornis.

Een andere grote troef van OPU/ICSI is dat zowel mature, preovulatoire als immature eicellen kunnen worden geaspireerd. Het is eveneens mogelijk om toch embryo's te bekomen van merries in (winter)anoestrus. Er zou immers geen effect zijn van het seizoen op de rijpingscompetentie van eicellen (Bruck et al., 1996). In het laboratorium van Galli et al. (2007) worden enkel follikels van minimum 5 mm gepuncteerd. Dit is de ondergrens om de eicelpunctie efficiënt te laten verlopen. De bekomen embryo's kunnen ingevroren worden en later worden overgepland bij een cyclerende draagmerrie (Choi et al., 2011). Een andere veelbelovende toepassing van ICSI is de productie van embryo's uit eicellen van overleden merries. Op deze manier kan het genetisch potentieel van waardevolle merries worden gevrijwaard (Carnevale et al., 2004).

Het overplanten van in vitro geproduceerde blastocysten geeft aanleiding tot gelijkaardige drachtigheidspercentages als conventionele ET van in vivo embryo's. De drachtigheidspercentages na het invriezen van in vitro geproduceerde embryo's zijn zelfs succesvoller dan ingevroren in-vivo-embryo's (45-67% versus 0-38%). De slechtere resultaten na het invriezen van grote in-vivo-embryo's worden veroorzaakt door de aanwezigheid van het glycoproteïnenkapsel, de grote blastocoeleinhoud, het differentiatiestadium en de grootte van



Figuur 5. (A) In vitro geproduceerde paardenblastocyst na 9 dagen in cultuur (50x vergroting). (B) In-vivoblastocyst uit de baarmoeder gespoeld zeven dagen na ovulatie (50x). (C) Detailopname van het acellulair kapsel (tussen pijlen) tussen de zona pellucida en het trofocoderm (D6-D21) (200x vergroting). Dit kapsel beschermt het embryo tijdens de migratiefase en transporteert endometriale componenten naar het embryo. Er is een algemene consensus dat de opbouw van dit acellulair kapsel tweedelig is. De eerste component wordt geproduceerd door het trofocoderm en de tweede component is afkomstig van uteriene secreties. Het is aangetoond dat de uteriene secretie uterocaline de embryonale kapselvorming stimuleert. Tijdens in-vitro-embryocultuur is de uteriene component afwezig in het medium waardoor dat het kapsel slechts lokaal op multiële plaatsen is aangelegd. Er wordt echter nooit een egaal doorlopend kapsel gevormd (Smits et al., 2012c).

het embryo (Choi et al., 2011) (Figuur 5). In-vitro-embryo's kunnen ingevroren worden bij het begin van de blastocoelvorming wanneer ze nog niet geëxpandeerd zijn. Bovendien vertonen deze embryo's een gebrekkige kapselvorming. Beide eigenschappen zijn voordelig voor het invriesproces (Choi et al., 2011).

Bij de hengst

Aangezien er voor ICSI slechts één spermacel nodig is per eicel, laat de techniek toe om toch te fokken met waardevolle, al dan niet overleden hengsten waarvan het beschikbare aantal spermacellen beperkt is. Zo hoeft er voor elke ICSI-sessie slechts een tiende tot een vijftiende van een 0,5 ml rietje ontdooid te worden (McCue et al., 2004). Choi et al. (2006) toonden aan dat het ontdooien, het honderdmaal verdunnen en het weer invriezen van het ontdooidde en verdunde sperma geen invloed hebben op het blastocystpercentage dat met dit sperma na ICSI wordt gegeneerd.

Bovendien heeft de spermakwaliteit geen invloed op het aantal overplantbare embryo's na ICSI. Zo kunnen ook subfertiele hengsten met een lage spermamotiliteit, al of niet na ontdooiing, of met een lage fertiliteit na kunstmatige inseminatie toch nog nakomelingen verwekken (Lazzari et al., 2002; Colleoni et al., 2009).

Zowel vers als diepvriessperma kan worden gebruikt voor ICSI (Choi et al., 2002). Choi et al. (2011) meldden de geboorte van een veulen na ICSI met gevriesdroogd sperma en Alonso et al. (2011) bekwamen morulae na ICSI met aan de lucht gedroogd sperma. Ook gesekst sperma en vers of diepgevroren epididymaal sperma werd reeds met succes gebruikt om embryo's te produceren (Carnevale et al., 2009). Op deze manier kan een overleden waardevolle hengst alsnog genetisch potentieel aan nakomelingen doorgeven. Indien de epididymale spermacellen binnen de 24 uur na het overlijden worden ingevroren, blijft de motiliteit van de spermatozoa na het ontdooien ongewijzigd (Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002).

Theoretisch gezien kan dankzij OPU/ICSI/IVC het aantal genetische combinaties verhoogd worden aangezien elke eicel met sperma van een andere hengst kan bevrucht worden. Eveneens is het van belang te benadrukken dat de selectie van spermacellen van subfertiele hengsten voor ICSI vrijwel geen invloed heeft op de fertiliteit van de ICSI-nakomelingen. Fertiliteit is maar in beperkte mate erfelijk (erfelijkheidsgraad = 0,10). Dit betekent dat vooral managementfactoren of verworven aandoeningen verantwoordelijk zijn voor subfertiliteit en dat het gevaar om deze nadelige eigenschappen door te geven aan een volgende generatie niet mag overschat worden (Mahon en Cunningham, 1982).

Wetenschappelijk onderzoek

OPU/ICSI/IVC zijn waardevolle hulpmiddelen om in-vitro-eicelmaturatie, fertilisatie/gameetinteractie (Leemans et al., 2011b; Smits et al., 2012a), embryogenese, embryometabolisme (Smits et al., 2009; Nelis et al., 2012b) (inclusief embryonaal stamcelonderzoek) en embryo-maternale interacties (Smits et al., 2012b) te bestuderen. Zo is een doorgedreven kennis van het embryo- en eicelmetabolisme noodzakelijk om het proces van invriezen verder te optimaliseren. Door vergelijkende genexpressiestudies tussen in-vivo- en in-vitro-embryo's (Smits et al., 2011) kunnen specifieke noden van in-vitro-embryo's geïdentificeerd worden, die kunnen bijdragen tot verbeteringen in het in-vitroproductieproces. Ook kunnen de bekomen eicellen en embryo's gebruikt worden voor andere geavanceerde technieken, zoals klonen (Galli et al., 2003b) en embryobiopname (Huhtinen et al., 1997).

Genenbank van bedreigde paardenrassen en paardachtigen

Wereldwijd zijn er een dertigtal gedomesticeerde rassen binnen het genus *Equus* (Equus National Trust), zoals de Baudet du Poitou en de Poitevin, met uitster-

ven bedreigd (De Weerd en Oldenbroek, 2010; Saastamoinen en Mäenpää, 2005). De toepassing van OPU/ICSI/IVC zou een belangrijke stap voorwaarts kunnen betekenen wat het behoud van de biodiversiteit met betrekking tot paardachtigen betreft (Smits et al., 2012d).

Zowel het invriezen van sperma, eicellen als embryo's is hierbij van belang: bij sommige bedreigde paardenrassen, zoals het Gronings paard, wordt bij castratie standaard epididymaal sperma ingevroren ten einde een genenbank aan te leggen (De Vos, 2006). Sinds enkele decennia worden reeds spermabanken van paarden aangelegd (Woelders et al., 2004). Ook het invriezen van eicellen kan theoretisch bijdragen tot het vergroten van de genetische pool om heterozygotiteit te waarborgen. In de praktijk werden er tot nu toe slechts twee veulens geboren uit ingevroren eicellen (MacLellan et al., 2002) en dient het protocol eerst verder geoptimaliseerd te worden. Paardenembryo's kunnen reeds ingevroren worden (zie supra) maar een embryobank voor bedreigde paardenrassen is nog niet aangelegd, terwijl dit wel reeds gebeurd is voor het rund, het schaap en de geit (Woelders et al., 2004).

NADELEN VAN OPU/ICSI/IVC

Hoewel OPU een vrij invasieve, tijdrovende techniek is, wordt de ingreep heel goed verdragen en worden er zelden neveneffecten waargenomen bij de donormerries, zelfs niet na herhaaldelijke sessies (Galli et al., 2002). Voor ICSI/IVC zijn een zeer gespecialiseerde, kostbare uitrusting en een doorgedreven expertise van de operator vereist. Dit zorgt ervoor dat ICSI enkel weggelegd is voor gespecialiseerde centra (Hinrichs en Choi, 2005). Hoewel ICSI reeds commercieel wordt aangeboden, onder andere in de VSA (Texas A&M University en Colorado State University), in Italië ("Avantea", Cremona), en in Australië (Goulburn Valley Equine Hospital), is de kans om uit een eicel een transfereerbaar embryo te bekomen eerder laag: 6–41% (Hinrichs en Choi, 2005; Jacobson et al., 2010; Smits et al., 2010).

CONCLUSIE

De in-vitroproductie van embryo's bij het paard kent de laatste decennia een grote vooruitgang. Er kan op deze technieken beroep gedaan worden wanneer de vraag ontstaat om veulens voort te brengen bij infertiele merries die niet met ET kunnen geholpen worden. In de toekomst kan de praktijkdierenarts in deze procedure een belangrijke rol vervullen (bijvoorbeeld eicelcollectie, eiceltransfer). Ovum pick-up, eicelmaturatie, ICSI en IVC zijn veelbelovende en waardevolle technieken die van zeer groot nut kunnen zijn in het wetenschappelijk onderzoek en de conservatie van genetisch potentieel van moeder- en vaderlijnen. Hoewel ICSI reeds commercieel wordt aangeboden, is de kans op een transfereerbaar embryo na OPU en bevruchting met ICSI eerder laag (6-41%). Bovendien zijn OPU/ICSI/IVC een dure aangelegenheid die enkel in

gespecialiseerde centra kunnen uitgevoerd worden. De kosten en baten moeten daarom vooraf doordacht afgewogen worden. Verder onderzoek is noodzakelijk om de efficiëntie van eicelmaturatie, in-vitrofertilisatie en in-vitro-embryocultuur verder te optimaliseren.

LITERATUUR

- Adams G.P., Bosu W.T.K. (1988). Reproductive physiology of the nonpregnant mare - an overview and update. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 4, 161-176.
- Alm H., Torner H., Blottner S., Nurnberg G., Kanitz W. (2001). Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogenology* 56, 817-829.
- Alonso A., Baca Castex C., Ferrante A., Pinto M., Castañeira C., Trasorras V., Gambarotta M. C., Losinno L., Miragaya M. (2011). Intracytoplasmic sperm injection of equine oocytes with air dried sperm: effect of activation with sperm extract and intrafallopian transfer. *Havemeyer foundation workshop*. Equine in vitro fertilization. November 10-12, 2011. Hilton Head, South Carolina, p. 15.
- Ball B.A., Little T.V., Weber J.A., Woods G.L. (1989). Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 85, 187-194.
- Betteridge K.J. (2006). Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives. *Theriogenology* 65, 905-913.
- Bézar J., Magistrini M., Battut I., Duchamp G., Palmer E. (1992). In vitro fertilization in the mare. *Recueil De Médecine Vétérinaire* 168, 993-1003.
- Bøgh I.B., Bezard J., Duchamp G., Baltsen M., Gerard N., Daels R., Greve T. (2002). Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes. *Theriogenology* 57, 1765-1779.
- Bruck I., Grondahl C., Host T., Greve T. (1996). In vitro maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. *Theriogenology* 46, 75-84.
- Bruck I., Raun K., Synnestvedt B., Greve T. (1992). Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Veterinary Journal* 24, 58-59.
- Bruemmer J.E., Reger H., Zibinski G., Squires E.L. (2002). Effect of storage at 5 degrees C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58, 405-407.
- Carnevale E.M. (2008). Clinical considerations regarding assisted reproductive procedures in horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 28, 686-690.
- Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Panzani D., Stokes J.E., Squires E.L. (2005). Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology* 64, 519-527.
- Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Preis K.A., Stokes J.E., Squires E.L. (2004). Establishment of pregnancies from oocytes collected from the ovaries of euthanized mares. *50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Colorado, p. 531-533.
- Carnevale E.M., Ginther O.J. (1995). Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biology of Reproduction Mono* 1, 209-214.
- Carnevale E.M., Graham J.K., Suh T.K., Stokes J.E., Squires E.L. (2009). Foals produced after icsi using frozen, sex-

- sorted, refrozen sperm. *Reproduction Fertility and Development* 21, 228-228.
- Carnevale E.M., Maclellan L.J., da Silva M.A.C., Squires E.L. (2003). Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanized mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222, 60-62.
- Carnevale E.M., Squires E.L., Maclellan L.J., Alvarenga M.A., Scott T.J. (2001). Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218, 87-91, 37.
- Castex C.B., Dalvit G., Miragaya M., Alonso A., Pinto M., Etcharren V., Castaneira C., Losinno L. (2011). Pregnancy rates after vitrification of fresh and cooled equine embryos using the cryotop method. *Reproduction Fertility and Development* 23, 144.
- Choi Y.H., Love C.C., Love L.B., Varner D.D., Brinsko S., Hinrichs K. (2002). Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction* 123, 455-465.
- Choi Y.H., Love C.C., Varner D.D., Hinrichs K. (2006). Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology* 65, 808-819.
- Choi Y.H., Okada Y., Hochi S., Braun J., Sato K., Oguri N. (1994). In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. *Theriogenology* 42, 795-802.
- Choi Y.H., Roasa L.M., Love C.C., Varner D.D., Brinsko S., Hinrichs K. (2004). Blastocyst formation rates in vivo and in vitro of in vitro matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction* 70, 1231-1238.
- Choi Y.H., Velez I.C., Riera F.L., Roldan J.E., Hartman D.L., Bliss S.B., Blanchard T.L., Hayden S.S., Hinrichs K. (2011). Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology* 76, 143-152.
- Cochran R., Meintjes M., Reggio B., Hylan D., Carter J., Pinto C., Paccamonti D., Godke R.A. (1998). Live foals produced from sperm injected oocytes derived from pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 18, 736-740.
- Colleoni S., Duchi R., Barbacini S., Necchi D., Mari G., Spinaci M., Lazzari G., Galli C. (2009). Practical applications of OPU, ICSI and IVC in equine reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 62-62.
- Cook N.L., Squires E.L., Ray B.S., Cook V.M., Jasko D.J. (1992). Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes: preliminary results. *Journal of Equine Veterinary Science* 12, 204-207.
- Cook N.L., Squires E.L., Ray B.S., Jasko D.J. (1993). Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Veterinary Journal* 25, 71-74.
- da Silva M.A.C. (2008). When should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology* 70, 441-444.
- De Vos L. (2006). Hinke Fiona Cnossen en haar zeldzame landbouwhuisdieren. *Magazine stichting zeldzame huisdierrassen*. Mei, Website link, consulted on January 10th 2012. Available: <http://www.szh.nl/index.php?id=226,672,0,0,1,0>.
- De Weerd M., Oldenbroek J.K. (2010). Nederlandse rassen. In : *Het paard in Nederland. Centrum voor Genetische bronnen Nederland (CGN) rapport 17*, 22-33.
- Dell'Aquila M.E., Fusco S., Lacalandra G.M., Maritato F. (1996). In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology* 45, 547-560.
- Dell'Aquila M.E., Cho Y.S., Minoia P., Traina V., Fusco S., Lacalandra G.M., Maritato F. (1997a). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir derived and in vitro matured equine oocytes. *Theriogenology* 47, 1139-1156.
- Dell'Aquila M.E., Cho Y.S., Minoia P., Traina V., Lacalandra G.M., Maritato F. (1997b). Effects of follicular fluid supplementation of in vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 12, 2766-2772.
- Duchamp G., Bezaud J., Palmer E. (1995). Oocyte yield and the consequences of puncture of follicles larger than 8 millimeters in mares. *Biology of Reproduction Mono 1*, 233-241.
- Galli C., Colleoni S., Duchi R., Lagutina I., Lazzari G. (2007). Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* 98, 39-55.
- Galli C., Crotti G., Turini P., Duchi R., Mari G., Zavaglia G., Duchamp G., Daels P., Lazzari G. (2002). Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 58, 705-708.
- Galli C., Duchi R., Crotti G., Turini P., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G. (2003a). Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59, 599-616.
- Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchi R., Lazzari G. (2003b). Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424, 635-635.
- Ginther O.J., Bergfelt D.R. (1992). Associations between Fsh concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. *Theriogenology* 38, 807-821.
- Goovaerts I.G.F., Leroy J.L.M.R., Merton J.S., Van Soom A., Bols P.E.J. (2007). In vitro productie van runderembryo's – een stand van zaken. Tien jaar na de eerste OU/IVF kalveren in België. *Vlaams Diergeneeskundige Tijdschrift* 76, 283-292.
- Goudet G., Bezaud J., Duchamp G., Gerard N., Palmer E. (1997). Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: Effect of follicle size and hormonal environment. *Biology of Reproduction* 57, 232-245.
- Hinrichs K. (2010). In vitro production of equine embryos: state of the art. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 3-8.
- Hinrichs K., Betschart R.W., McCue P.M., Squires E.L. (2000). Effect of timing of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 493-498.
- Hinrichs K., Choi Y.H. (2005). Assisted reproductive techniques in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice* 4, 210-218.
- Hinrichs K., Love C.C., Brinsko S.P., Choi Y.H., Varner D.D. (2002). In vitro fertilization of in vitro matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. *Biology of Reproduction* 67, 256-262.
- Hinrichs K., Matthews G.L., Freeman D.A., Torello E.M. (1998). Oocyte transfer in mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 212, 982-986.
- Huhtinen M., Peippo J., Bredbacka P. (1997). Successful

- transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology* 48, 361-367.
- Jacobson C.C., Choi Y.H., Hayden S.S., Hinrichs K. (2010). Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 73, 1116-1126.
- James A.N., Green H., Hoffman S., Landry A.M., Paccamonti D., Godke R.A. (2002). Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 degrees C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58, 401-404.
- Kanitz W., Becker F., Alm H., Torner H. (1995). Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. *Biology of Reproduction Mono 1*, 225-231.
- Lazzari G., Crotti G., Turini P., Duchi R., Mari G., Zavaglia G., Barbacini S., Galli C. (2002). Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Theriogenology* 58, 709-712.
- Leemans B., Gadella B.M., Sostaric E., Nelis H., Hoogewijs M., Van Soom A. (2011a). Spermacapacitatie bij het paard : een rol voor de oviduct? *Vereniging voor Fertiliteitsstudie*. Utrecht, Nederland.
- Leemans B., Nelis H.M., Hoogewijs M., Vandaele L., Van Soom A. (2011b). Whittens medium maintains oviduct cell viability and facilitates oviduct-sperm binding in the horse. GEMINI COST Action FA0702. Gijon, Spain.
- Lena M. (1998). Effectiveness of two systems for transporting equine semen. *Theriogenology* 50, 833-839.
- Li L.Y., Meintjes M., Graff K.J., Paul J.B., Denniston R.S., Godke R.A. (1995). In vitro fertilization and development of in vitro-matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biology of Reproduction Mono 1*, 309-317.
- Li X.H., Morris L.H.A., Allen W.R. (2001). Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction* 121, 925-932.
- Maclellan L.J., Carnevale E.M., da Silva M.A.C., Scoggin C.F., Bruemmer J.E., Squires E.L. (2002). Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology* 58, 911-919.
- Mahon G.A.T., Cunningham E.P. (1982). Inbreeding and the inheritance of fertility in the thoroughbred mare. *Livestock Production Science* 9, 743-754.
- McCue P.M., Squires E.L. (2002). Persistent anovulatory follicles in mares. *Theriogenology* 58, 541-543.
- McCue P.M., Kelly J.M., Moore A.I., Bruemmer J.E., Walker S.K. (2004). Refrozen semen: sperm characteristics in horses and in vitro embryo production in ruminants. In: Alvarenga M. en Wade J.F. (editors). In: *Proceedings of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 14, 4th-6th August 2004, Rio de Janeiro, Brazil.
- McKinnon A.O., Lacham-Kaplan O., Trounson A.O. (2000). Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen thawed spermatozoa into in vivo matured oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 56, 513-517.
- McKinnon A.O., Squires E.L., Carnevale E.M., Herment M.J. (1988). Ovariectomized steroid treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progesterins in pregnancy maintenance. *Theriogenology* 29, 1055-1063.
- McPartlin L.A., Littell J., Mark E., Nelson J.L., Travis A.J., Bedford-Guaus S.J. (2008). A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis. *Theriogenology* 69, 639-650.
- McPartlin L.A., Suarez S.S., Czaya C.A., Hinrichs K., Bedford-Guaus S.J. (2009). Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biology of Reproduction* 81, 199-206.
- Meintjes M., Bellow M.S., Paul J.B., Broussard J.R., Li L.Y., Paccamonti D., Eilts B.E., Godke R.A. (1995). Transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilisation. *Biology of Reproduction Mono 1*, 281-292.
- Merton J., de Roos A.P.W., Mullaart E., de Ruigh L., Kaal L., Vos P.L.A.M., Dieleman S.J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59, 651-674.
- Mugnier S., Kervella M., Douet C., Canepa S., Pascal G., Deleuze S., Duchamp G., Monget P., Goudet G. (2009). The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reproductive Biology and Endocrinology* 7, 129.
- Nelis H.M., Leemans B., de Vries C., Hoogewijs M., Chiers K., Van Soom A., Govaere J. (2012a). Oviductal and uterine leiomyomata in the mare. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. Submitted.
- Nelis H.M., Leemans B., Van Soom A. (2012b). Culturing horse oocytes and embryos at the physiological temperature of the mare. In: *Proceedings 8th International Symposium on Equine Embryo Transfer*. Vancouver, British Columbia.
- Palmer E., Bezard J., Magistrini M., Duchamp G. (1991). In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 44, 375-384.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet* 340, 17-18.
- Pieterse M.C., Kappen K.A., Kruip T.A.M., Taverne M.A.M. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30, 751-762.
- Ponsart C. (2010). Embryo transfer activity in 2010. *27th Annual Meeting A.E.T.E.* Chester, England, p. 27.
- Ribeiro B.I., Love L.B., Choi Y.H., Hinrichs K. (2008). Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Animal Reproduction Science* 108, 171-179.
- Saastamoinen M.T., Mäenpää M. (2005). Rare horse breeds in Northern Europe. In: Bodó I., Alderson L., Langlois B. (editors). *Conservation Genetics of Endangered Horse Breeds*. EAAP publication no. 116. Wageningen Academic Publishers, p. 129-136.
- Scott M.A., Liu I.K.M., Overstreet J.W. (1995). Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical applications. *30th Annual Convention of the AAEP*, p. 1-2.
- Smits K., Goossens K., Van Soom A., Govaere J., Hoogewijs M., Peelman L.J. (2011). In vivo derived horse blastocysts show transcriptional upregulation of developmentally important genes compared with in vitro produced horse blastocysts. *Reproduction Fertility and Development* 23, 364-375.
- Smits K., Govaere J., Hoogewijs M., De Schauwer C., Van Haesebrouck E., Van Poucke M., Peelman L., van den Berg M., Vullers T., Van Soom A. (2010). Birth of the first ICSI foal in the Benelux. *Vlaams Diergeneeskundig Tijd-*

- schrift* 79, 134-138.
- Smits K., Govaere J., Hoogewijs M., Piepers S., Van Soom A. (2012a). A pilot comparison of laser assisted vs piezo drill ICSI for the in vitro production of horse embryos. *Reproduction in Domestic Animals* 47, e1-e3.
- Smits K., Govaere J., Peelman L.J., Goossens K., De Graaf D.C., Vercauteren D., Vandaele L., Hoogewijs M., Wydooghe E., Stout T., Van Soom A. (2012b). Culturing horse oocytes and embryos at the physiological temperature of the mare. *Society for Reproduction and Fertility* 143, 173-181.
- Smits K., Govaere J., Peelman L. J., Goossens K., de Graaf D.C., Vercauteren D., Vandaele L., Hoogewijs M., Wydooghe E., Stout T., Van Soom A. (2012c). Influence of the uterine environment on the development of in vitro produced equine embryos. *Reproduction* 143, 173-181.
- Smits K., Hoogewijs M., Woelders H., Daels P., Van Soom A. (2012d). Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. *Reproduction in Domestic Animals* 47 (Supplement 4), 1-10.
- Smits K., Van Soom A., Govaere J., Hoogewijs M., Vanhaesebrouck E., Galli C., Colleoni S., Vandesompele J., Peelman L. (2009). Selection of reference genes for quantitative real time PCR in equine in vivo and fresh and frozen thawed in vitro blastocysts. *BMC Research Notes* 2, 246.
- Squires E.L., Carnevale E.M., McCue P.M., Bruemmer J.E. (2003). Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 59, 151-170.
- Squires E.L., Wilson J.M., Kato H., Blaszczyk A. (1996). A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 45, 306.
- Steptoe P.C., Edwards R.G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* 312, 366.
- Suarez S.S. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction of Domestic Animal* 37, 140-143.
- Suarez S.S. (2008a). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update* 14, 647-657.
- Suarez S.S. (2008b). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *International Journal of Developmental Biology* 52, 455-462.
- Vandenbergh L.T.M., Govaere J., Nelis H., Hoogewijs M., Daels P., Van Soom A. (2012). Embryotransplantatie bij het paard: onmisbaar in de moderne fokkerij. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 81, 274-282.
- Woelders H., Zuidberg C.A., Sulkers H., Hiemstra S.J. (2004). Preservation of genetic diversity of farm animals, gene-banking and germplasm. In: *Proceedings of the 20th Scientific Meeting of the European Transfer Association (Association Européenne de Transfert Embryonnaire, AETE)*. Lyon, France, p. 87-95.

Uit het verleden

GRAFMONUMENTJE VOOR EEN KANARIE (18^{DE} EEUW)

Met de essentie van het gezelschapsdierenleven in het onderschrift (hier in vertaling):

*In zachte slavernij genoot je een mooi leven.
De vrijheid betekende jou dood, kleine zanger.
Waarom verliet je jou kooi?*

*Hier ligt Fifi
Geboren 3 mei 1767
Gestorven 7 april 1772*



Ontwerp in gebakken aarde door Claude Michel (gezegd Clodion, 1738 – 1814, collectie van het kasteel van Ecouen). Vermoedelijk gemaakt in opdracht van Mme. Bergeret de Grancourt. Samen met haar echtgenoot, een financier, bezat ze meerdere dergelijke werkjes, allen minimausoleumpjes voor hun huisdieren. Nu pronken ze in verschillende Franse musea (met dank aan Marianne Devogele).

Luc Devriese