

## ***In vitro* productie van runderembryo's: een stand van zaken 10 jaar na de eerste OPU/IVP-kalveren in België**

<sup>1</sup>I.G.F. Goovaerts, <sup>1</sup>J.L.M.R. Leroy, <sup>2</sup>J.S. Merton, <sup>3</sup>A. Van Soom, <sup>1</sup>P.E.J. Bols

<sup>1</sup>Laboratorium voor de Fysiologie van de Huisdieren, Departement Diergeneeskunde, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, Gebouw U, B-2610 Wilrijk

<sup>2</sup>HG, P.O. Box 5073, 6802 EB Arnhem, Nederland

<sup>3</sup>Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Ilse.Goovaerts@ua.ac.be

### **SAMENVATTING**

Iets meer dan een decennium geleden werden in België de eerste kalveren geboren na transfer van *in vitro* geproduceerde embryo's, gekweekt met eicellen die bij levende donoren via transvaginale weg en onder echografische controle werden geaspireerd (ovum pick-up/*in vitro* productie, OPU/IVP). Hoewel deze techniek haar voordelen zeker heeft bewezen, wordt zij in België nagenoeg niet commercieel toegepast, terwijl er daarentegen wel routinematig embryo's *in vitro* worden gekweekt voor wetenschappelijke doeleinden. In bepaalde delen van de wereld, met Azië en Zuid-Amerika als koplopers, worden echter steeds meer kalveren geboren na het overplanten van *in vitro* embryo's. Naast deze mogelijk commerciële voordelen heeft het kweken van proefbuisembryo's in de loop der jaren waardevolle wetenschappelijke informatie opgeleverd over processen, zoals eicelmaturatie, de bevruchting van eicellen en de fysiologie van de eerste embryonale delingsstadia en over factoren die een invloed hebben op de eicel- en embryokwaliteit.

In dit artikel wordt een kort overzicht gegeven van de evolutie van de geassisteerde voortplantingstechnieken bij het rund. Vervolgens wordt ingegaan op de voor- en nadelen en de mogelijke opbrengst ervan. Dit wordt geïllustreerd aan de hand van gegevens van over gans de wereld, zodat de lezer een duidelijk beeld krijgt van de internationale implementatie van de geassisteerde voortplantingstechnieken bij het rund. Tenslotte wordt kort ingegaan op de mogelijkheden van OPU/IVP in het kader van wetenschappelijk onderzoek.

### **INLEIDING**

Tussen het moment waarop men is gestart met het routinematig toepassen van kunstmatige inseminatie in reproductieprogramma's bij onze nutsdieren, ruim een eeuw geleden, en de regelmatige actuele meldingen van alweer een andere species die gekloond werd, ligt een jarenlange hoogtechnologische (r)evolutie. Daar waar de introductie en het massale gebruik van kunstmatige inseminatie (KI) in eerste instantie werden ingegeven door sanitaire overwegingen – er was minder risico op besmetting dan wanneer met stieren van bedrijf tot bedrijf werd gegaan – leerde men gaandeweg de bijkomende voordelen op het vlak van de genetische selectie kennen. Het verzamelen, verdunnen, bewaren en invriezen van stierensperma werd door de jaren heen technisch zeer gemakkelijk en relatief goedkoop en wordt daarom samen met KI wereldwijd met groot succes toegepast om de genetische selectie aan mannelijke zijde te bevorderen. Dit bracht met zich mee dat enkele genetisch hoogwaardige stieren een zeer sterke impact hadden op de genetica van een volledig ras. Zo zijn er stieren bekend die enkele honderdduizenden nakomelingen hebben (Thibier, 2005). Manieren vinden om de genetische vooruitgang aan vrouwelijke

zijde te versnellen, was echter minder vanzelfsprekend. Hoewel het principe op zich niet echt ingewikkeld is, bleken het genereren en uitspoelen van extra embryo's uit het donordier – na superovulatie volgend op hormonale stimulatie – en het overplanten van deze embryo's in gesynchroniseerde ontvangsters (MOET = multiple ovulation and embryo transfer) lang niet in alle gevallen even succesvol. In tweede instantie bleek deze embryotransfer (ET) ook goed bruikbaar bij de implementatie van de meest recente technieken van geassisteerde voortplanting waarbij *in vitro* geproduceerde proefbuisembryo's (IVP-embryo's) in ontvangsters kunnen worden overgeplant.

### **Historiek van de *in vivo* embryoproductie**

Vanaf het begin van de jaren '70 werd ET routinematig toegepast waarbij de *in vivo* ontwikkelde embryo's initieel via een invasieve flankoperatie werden gecollec-teerd en overgeplant. Een niet-invasieve techniek voor het uitspoelen en transfereren werd beschikbaar in het begin van de jaren '80. Bij deze techniek dient de donorkoe eerst gesuperovuleerd te worden door middel van een hormoonbehandeling, waardoor meerdere eicellen ovuleren en waarna de koe wordt gedekt of geïnsemineerd. Onge-

veer vijf à zes dagen later bereiken de embryo's de uterus en kunnen ze uitgespoeld worden. Embryo's van goede kwaliteit kunnen dan getransfereerd worden naar receptorkoeien of ze worden ingevroren. Per koe kunnen per jaar gemiddeld 50 invriesbare embryo's verzameld worden, en na embryo-transplantatie worden daaruit ongeveer 30 kalveren geboren (Merton *et al.*, 2003).

Hét grote nadeel bij MOET is de grote variabiliteit in respons op de hormoonbehandeling tussen de verschillende koeien, waardoor lang niet voor alle donoren een voldoende groot aantal nakomelingen kan worden gegenereerd binnen een bepaalde, dikwijls beperkte tijdsperiode. Looney *et al.* (1986) rapporteerden in het midden van de jaren tachtig, op basis van 2048 spoelingen, een gemiddelde opbrengst van 6,2 transfereerbare embryo's per donor per verzameling. Bij 24% van de spoelingen werd echter geen levend embryo teruggevonden en bovendien werd 70% van alle embryo's bekomen uit 30% van de spoelingen. In Vlaanderen rapporteerden Leroy *et al.* (2005b) recentelijk gemiddeld 6,1 transfereerbare embryo's per spoeling bij lacterende hoogproductieve melkkoeien, 5,1 embryo's bij niet-lacterend melkvee en 4,2 embryo's bij Belgisch Witblauwe vleeskoeien. De belangrijkste oorzaak van de variabiliteit in respons op de hormoonbehandeling tussen koeien is de status van de ovariële follikels bij de start van de stimulatiekuur. Verder dragen ook de aard en productiemethode van het hormoonpreparaat, de dosis, het doseringsschema en natuurlijk het individuele dier en zijn omgeving bij tot deze variabiliteit (Mapletoft *et al.*, 2002). Wereldwijd worden MOET-programma's nu ruim 30 jaar commercieel toegepast, met inbegrip van ontelbare variaties op de hogergenoemde factoren, maar de opbrengst per koe per spoeling is gedurende de laatste 20 jaar niet meer gestegen en stabiel gebleven rond 5 embryo's (Hasler, 1998; Mapletoft *et al.*, 2002; van Wagendonck-de Leeuw, 2006). Bij een grote retrospectieve studie uitgevoerd door 'the American Holstein Association' (Hasler, 2006) werd gedurende de voorbije 20-25 jaar een kleine daling van de drachtigheidspercentages na MOET opgemerkt, die deels te wijten zou kunnen zijn aan de overgang van chirurgische naar niet-chirurgische ET. Anderzijds is ook bekend dat, gelinkt aan de enorme melkgiftoename, de vruchtbaarheid van melkkoeien de laatste decennia sterk is gedaald (Butler, 2003; Leroy en de Kruif, 2006). Deze daling zet zich duidelijker door bij lacterende koeien, waarbij meer embryo's van geringere kwaliteit worden gevonden, dan bij niet-lacterende dieren (Wiltbank *et al.*, 2001; Sartoli *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2005b). De retrospectieve studie van Hasler (2006) bracht ook aan het licht dat steeds meer embryo's, tegenwoordig meer dan de helft, eerst ingevroren worden.

### Geschiedenis van de *in vitro* embryoproductie

Ondertussen werd ook, in de marge van de geboorte van de eerste proefbuisbaby, Louise Brown in 1978 (Stephoe en Edwards), steeds meer onderzoek verricht naar de *in vitro* productie van boviene embryo's. Het *in vitro* bevruchten van een geovuleerde, en dus reeds uitgerijpte eicel, gaf in juni 1981 aanleiding tot het eerste *in vitro* geproduceerd kalf Virgil (Brackett *et al.*, 1982). In 1987 werd een kalf geboren uit een eicel die na de bevruchting *in vitro* tijdelijk overgezet werd in de eileider van een schaap en na 6

dagen als blastocyst in een receptorkoe werd overgeplant (Lu *et al.*, 1987). In 1990 werd het eerste kalf geboren uit een embryo waarbij alle stappen *in vitro* werden uitgevoerd (Fukuda *et al.*, 1990). In België werd in 1994 een drachtigheidspercentage van 33% gerapporteerd na embryo-transfereer van *in vitro* geproduceerde embryo's, uitgaande van eicellen van Belgisch Witblauwe slachtkoeien, in receptoren van het melktype (Van Soom *et al.* 1994).

*In vitro* embryoproductie (IVP) kan ook uitgevoerd worden met eicellen die werden bekomen via echogeleide, transvaginale aspiratie van ovariële follikels bij levende donoren. Via deze ovum pick-up (OPU) techniek, die eind jaren '80 in Nederland vanuit de humane reproductieve geneeskunde werd gemodificeerd voor het gebruik bij het rund (Pieterse *et al.*, 1988), kunnen, eventueel na hormonale stimulatie, meerdere eicellen per koe per punctiesessie verkregen worden (Bols *et al.*, 1994). Deze eicellen zijn evenwel niet afkomstig uit preovulatoire follikels en moeten daarom eerst *in vitro* gerijpt of gematureerd worden. Ovum pick-up gevolgd door IVP, kortweg OPU/IVP, leverde routinematig kalveren op vanaf het begin van de jaren '90, vooral in de Verenigde Staten waar enkele grote vermeerderingsbedrijven actief waren. In België werden de eerste OPU/IVP-kalveren uit eicellen van Belgisch Witblauwe donorkoeien geboren in 1995 (Bols *et al.*, 1996).

Ruim een decennium na deze feiten wordt in dit artikel nagegaan wat de techniek ons reeds heeft geleerd en wat de toepassingsmogelijkheden maar ook de eventuele beperkingen zijn van OPU/IVP in praktijkomstandigheden. Ook wordt nagegaan of *in vitro* embryoproductie in België, Europa en de rest van de wereld nog steeds aangevend wordt, en in hoeverre IVP gebruikt wordt in het wetenschappelijk onderzoek.

### COMMERCIELE TOEPASSINGEN VAN *IN VITRO* EMBRYOPRODUCTIE (OPU/IVP)

Sinds de initiële ontwikkeling van de OPU-techniek (zie hoger) werden er verschillende technische veranderingen en verbeteringen aangebracht, vooral dan met betrekking tot de te gebruiken aspiratiedruk en naaldtypen en met betrekking tot een verbeterde beeldkwaliteit van de gebruikte echografietoestellen (Bols *et al.*, 1995; Bols *et al.*, 2005; Wagendonck-de Leeuw, 2006). Anderzijds werd en wordt er ook gesleuteld aan de biologische factoren die de uiteindelijke opbrengst van eicellen en embryo's bepalen. De opbrengst na OPU/IVP is immers, net zoals bij MOET, zeer sterk 'koeafhankelijk'. Ook andere factoren hebben echter een duidelijke invloed, met name het moment en de frequentie van de OPU-sessies, de eventueel voorafgaande hormoonbehandeling en niet in het minst de ervaring van de operator (Bols *et al.*, 2005). Ook het daaropvolgende *in vitro* luik, met name de maturatie, bevruchting en cultivering, heeft een ontegensprekelijk effect op de embryo-opbrengst. Zo heeft bij HG, het vroegere Holland Genetics, het toevoegen van het antioxidans cysteamine aan het maturatiemedium ertoe geleid dat het aantal embryo's per sessie van 1 naar 1,7 is gestegen (Merton *et al.*, 2005).

Als er geen hormoonbehandeling wordt toegepast, worden er meestal 2 punctiesessies per week uitgevoerd.

(Merton *et al.*, 2003; van Wagendonck-de Leeuw, 2006). Uit het geaspireerde follikelvocht worden eicellen, die omgeven zijn door voldoende lagen cumuluscellen (cumulus oocyte complex, COC), geïsoleerd en *in vitro* gematureerd, bevrucht en opgekweekt tot embryo's. Zes tot acht dagen oude embryo's van goede kwaliteit kunnen dan overgepland worden in receptorkoeien of worden ingevroren. In een recente studie in België (De Roover *et al.*, 2005) werden gemiddeld 11,9 follikels per sessie gepuncteerd, waarbij 5,6 COC's werden teruggevonden, waarvan 32% van goede kwaliteit. Zeven dagen na *in vitro* fertilisatie werden hieruit gemiddeld 2,0 embryo's bekomen. Het aantal embryo's dat uiteindelijk per punctie-sessie wordt verworven, varieert tussen de verschillende uitvoerders en ligt over het algemeen tussen de 1,5 en 5. Gemiddeld gezien ontwikkelt 25 tot 30% van de eicellen zich na 7 dagen tot een transfereerbaar embryo; ongeveer de helft daarvan blijkt invriesbaar (Hasler *et al.*, 1995; van Wagendonck-de Leeuw, 2006). In een eerdere studie van Hasler *et al.* (1995) werd, na een transfer van 2268 verse, 7 dagen oude embryo's, 53,8% van de koeien drachtig.

Daarentegen kon maar een drachtigheidspercentage van 42% teruggevonden worden na een transfer van ontdooide embryo's, ingevroren op de leeftijd van 7 dagen. HG genereerde meer recentelijk vergelijkbare resultaten: het drachtigheidspercentage na een transfer van verse embryo's schommelde tussen 50 en 55%, terwijl het gebruik van ontdooide embryo's resulteerde in 45 tot 50% drachtige ontvangsters (persoonlijke communicatie). De commerciële toepassing van de *in vitro* embryoproductie ligt voor de hand, al zijn er ook specifieke nadelen aan verbonden. Het bekomen van een groter aantal kalveren van een topkoe is echter niet de enige reden om IVP uit te voeren. De techniek wordt namelijk ook aangewend in verschillende gebieden van het wetenschappelijk onderzoek (zie verder).

## Voordelen

Wanneer alle stappen van de IVP-keten optimaal verlopen, kunnen er in combinatie met OPU en in vergelijking met de klassieke MOET-programma's meer embryo's per koe per jaar bekomen worden - tussen de 80 tot 150 (Europese rassen) - die dan kunnen resulteren in ongeveer 40 tot 75 kalveren. In commerciële programma's zijn er immers 2 of 3 OPU-sessies mogelijk per week (Merton *et al.*, 2003; van Wagendonck-de Leeuw, 2006), met inachtnaam van grote individuele koefluctaties. In de studie van Hasler *et al.* (1995) bleek 6% van de donoren verantwoordelijk voor 47% van de eicellen, terwijl 7,2% van de inzamelingen geen eicellen opleverden. Het aantal eicellen per donor blijft daarbij vrij constant, al leek het te dalen na een groot aantal inzamelingen. Toch kan bij het gebruik van OPU/IVP, in tegenstelling tot MOET, van bijna elke donorkoe een (groot) aantal nakomelingen bekomen worden binnen een redelijke tijdsperiode (Van Soom *et al.*, 1997).

Dat de actuele fertiliteit van de donor (= mogelijkheid om per *viam* naturaem drachtig te worden) er weinig toe doet, wordt aangetoond in diezelfde studie van Hasler *et al.* (1995), waarbij de gemiddelde leeftijd van de donoren meer dan 8 jaar was. Een groot deel onder hen werd beschouwd als onvruchtbaar omwille van allerlei redenen, zoals ondoorgankelijke eileiders, adhesies en cysteuzen

ovaria. De Roover *et al.* (2003) gebruikten de OPU/IVP-techniek om embryo's te produceren van donorkoeien die onbruikbaar waren geworden na herhaaldelijke spoelingen in een klassiek embryotransferprogramma. Ook lacterende koeien die te kampen hebben met hittestress, waardoor anoestrus of suboestrus optreedt, kunnen baat hebben bij een embryotransfer van verse IVP-embryo's (Al-Katanani *et al.*, 2002). Wel moet er nauwgezet op toegezien worden dat dieren die gebruikt worden als IVP-donor niet genetisch belast zijn met een lagere vruchtbaarheid, maar hun verminderde fertiliteit pas later verworven hebben. Bij HG is 20 tot 25% van de IVP-donoren koeien die mindere resultaten behaalden na MOET.

Het generatie-interval kan door de toepassing van OPU/IVP bovendien verder ingekort worden via laparoscopische OPU bij juveniele vaarzen vanaf de leeftijd van 2-3 maanden (Taneja *et al.*, 2000) of recentelijk nog jonger (Kauffold *et al.*, 2005). De belangrijkste tegenargumenten voor een dergelijke eicelverzameling hebben betrekking op de verhoogde kans op vergroeiingen, de verminderde efficiëntie van IVP en het feit dat de productiecapaciteiten van de juveniele donor nog volledig onbekend zijn (van Arendonk en Bijma, 2003). Nieuwe technieken, zoals 'marker assisted selection' (MAS) en 'genome-wide selection' zouden er in de toekomst kunnen voor zorgen dat de 'voorgeprogrammeerde' productiecapaciteiten van het dier in wording wel al goed ingeschat kunnen worden op kalf- of zelfs al op embryoniveau (zie verder).

Naast prepuberale dieren kunnen ook drachtige donoren gepuncteerd worden tijdens het eerste derde van de dracht, wat uiteraard niet kan bij de productie van *in vivo* embryo's (van Wagendonck-de Leeuw, 2006). Bij HG worden ongeveer 1200 embryo's per jaar geproduceerd met eicellen afkomstig van drachtige vaarzen. Later tijdens de dracht zakken de ovaria té diep weg in de buikholte om nog via de transvaginale route gepuncteerd te kunnen worden.

Een bijkomend voordeel van OPU/IVP ten opzichte van MOET is het feit dat de donoren niet hormonaal hoeven gestimuleerd te worden voor de punctie, al wordt dit in de praktijk soms wel gedaan. Zo werden er reeds veel verschillende combinaties uitgetoetst van FSH/LH-stimulatieprotocollen en punctieschema's (Bols *et al.*, 2005; Chaubal *et al.*, 2006) waarbij de hormonale doses zelfs per donor werden aangepast (De Roover *et al.*, 2005). Het gebruik van hormonale stimulatie voor OPU stoot echter op dezelfde problemen als de klassieke MOET, met name grote individuele koefluctaties met betrekking tot de ovariële respons. Bovendien is het ook niet mogelijk de hormonale stimulatie gedurende een langere tijd toe te passen, zodat het er meestal op neerkomt dat een schema met twee punctie-sessies per week zonder hormonale stimulatie finaal de meeste embryo's oplevert.

Theoretisch gezien kan dankzij OPU/IVP het aantal genetische combinaties verhoogd worden, want in principe kan elke eicel met het sperma van een andere stier bevrucht worden (Merton *et al.*, 2003; van Wagendonck-de Leeuw, 2006).

Het combineren van de klassieke MOET en OPU/IVP blijkt de beste manier om een zo groot mogelijk aantal nakomelingen per koe te bekomen (Durocher, 2006). Een embryotransfer is bovendien de veiligste manier om genen uit te wisselen, tenminste als de voorschriften inzake

bioveiligheid gerespecteerd worden. De juiste handelwijzen voor het genereren van en het omgaan met kiemvrije *in vivo* en *in vitro* embryo's staan uitvoerig beschreven in de handleiding van de International Embryo Transfer Society (IETS) (Mapletoft en Stookey, 1998; Nibart *et al.*, 1998). Hierbij blijkt het transfereren van *in vivo* embryo's veiliger dan *in vitro* embryo's, waarbij bepaalde pathogenen, zoals het boviene virale diarreevirus (BVD) en het infectieuze boviene rhinotracheïtisvirus (IBR), zich gemakkelijker aan de zona pellucida gaan hechten (Thibier, 2006). Ondanks het feit dat tijdens de vele stappen van de *in vivo* en *in vitro* embryoproductie contaminatie kan plaatsgrijpen, gebeuren dankzij de professionaliteit van de uitvoerders de productie en transfer van internationaal verhandelde embryo's zo goed als kiemvrij (Thibier, 2006). Zowel MOET als OPU/IVP geeft de mogelijkheid de embryo's in te vriezen waardoor ze wereldwijd gecommmercialiseerd kunnen worden (Thibier, 2005).

### Nadelen

Bij het laatstgenoemde voordeel, de mogelijkheid van het invriezen van embryo's, dient onmiddellijk te worden vermeld dat IVP-embryo's het invriesproces minder goed overleven dan uitgespoelde *in vivo* geproduceerde embryo's. Onderzoek heeft uitgewezen dat dit vooral veroorzaakt wordt door het hoge vetgehalte in de *in vitro* geproduceerde embryo's. In het maturatie- en cultuurmedium wordt namelijk vaak kalver- of koeierserum toegevoegd omdat het de embryo-ontwikkeling versnelt en ondersteunt door de aanwezigheid van onder andere aminozuren, vitaminen en groeifactoren (Reis *et al.*, 2003). Serum zou anderzijds schadelijk zijn voor de eerste delingsstadia en bovendien het vetgehalte van de embryo's verhogen, waarbij vooral grote vetdruppels nefast zijn voor de cryotolerantie (Abe *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2003). Embryo's kunnen ook gecultiveerd worden in afwezigheid van serum, met een lagere productie tot gevolg. Deze embryo's zijn iets beter bestand tegen het invriezen, omdat ze inderdaad minder vet bevatten. De invriesbaarheid blijft echter toch slechter dan deze van *in vivo* embryo's (Abe *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003; Leroy *et al.*, 2005a).

Het gebruik van serum in het medium kan ook deels een ander nadeel van *in vitro* geproduceerde embryo's verklaren. In vergelijking met drachten bekomen na KI, is het bekend dat drachten van IVP-embryo's beduidend meer aanleiding geven tot de vorming van abnormale placenta's en/of kalveren. In de literatuur wordt dit fenomeen vaak omschreven als het 'Large Offspring Syndrome' (Kruip en den Daas, 1997). Bij drachten van *in vitro* geproduceerde embryo's ziet men meer vroegembryonale sterfte, abortus, abnormale ontwikkeling van de vruchtvlies, abnormale groei van organen, misvormde foeti en een verlengde dracht. Als de kalveren geboren worden, blijken ze vaak té zwaar en té groot waardoor ze geboorteproblemen veroorzaken of zelfs dood geboren worden. Andere kalfjes hebben allerlei afwijkingen, bijvoorbeeld van het ruggenmerg of de ledematen. Ook worden er verhoudingsgewijs meer mannelijke dieren geboren (Van Soom *et al.*, 1994; van Wagtenonk-de Leeuw *et al.*, 1998; Hasler, 2000; Farin *et al.*, 2006). In de Belgische studie werd 71% stierkalveren geboren, trad bij 21% van

de ontvangsters die op 6 weken drachtig waren, nadien nog een abortus op en stierven 2 van de 35 kalveren door congenitale afwijkingen (Van Soom *et al.*, 1994). De studie van Hasler *et al.* (1995) rapporteerde ongeveer 9% abortussen en 15,6% van de IVP-kalveren stierf bij de geboorte, tegenover respectievelijk 5% en 9% bij de klassieke MOET. Bij een grote studie in Nederland werd 3,2% van de IVP-kalveren geboren met afwijkingen terwijl maar 0,7% van de kalveren, geboren na KI, misvormingen had. Het geboortegewicht van IVP-kalveren lag gemiddeld 10% hoger en de dracht duurde 3 dagen langer dan normaal (van Wagtenonk-de Leeuw *et al.*, 1998). Een gewijzigde timing van de cel-celinteracties tijdens de vroegembryonale ontwikkeling, waardoor ook de timing van de genexpressie en de daarop volgende organogenese zou wijzigen, zou mede aan de basis liggen van dit probleem (Boerjan *et al.*, 2000). Het zoeken naar dieperliggende oorzaken, zoals bijvoorbeeld een gewijzigde genexpressie, heeft tot op heden nog niets bruikbaar opgeleverd zodat het vroeg diagnosticeren van dit syndroom nog niet mogelijk is (Farin *et al.*, 2006). Het gebruik van serum tot een minimum beperken tijdens de cultuurperiode kan allicht een deel van de oplossing zijn. Gelukkig is de overgrote meerderheid van de IVP-kalveren wel fysiek normaal (van Wagtenonk-de Leeuw *et al.*, 1998; Hasler, 2000; Farin *et al.*, 2006). Bovendien zijn er ook nog geen negatieve effecten gevonden op de voortplantingskarakteristieken van donoren en stieren die via OPU/IVP geproduceerd werden (van Wagtenonk, 2000).

De *in vitro* productie van embryo's is zeer arbeidsintensief en vooral in westerse landen met hoge loonkosten geeft dit aanleiding tot dure embryo's. De kosten voor een *in vitro* embryo zijn ongeveer twee keer zo hoog als voor een uitgespoeld, *in vivo* embryo (van Wagtenonk-de Leeuw, 2006). Ook in lage loonlanden zijn IVP-embryo's duurder, met name door de hogere laboratoriekosten (Thibier, 2005). De *in vitro* productie blijft immers een technisch complexe vorm van geassisteerde voortplanting, hoewel de nodige toestellen, zoals een CO<sub>2</sub>-incubator, laminaire flow en invriestoeestellen de laatste jaren in goedkopere en meer mobiele uitvoeringen verkrijgbaar zijn. Daarbovenop komen natuurlijk de kosten van de aankoop van een echografietoestel, een aspiratiepomp en punctienaalden als men verkiest eicellen te gebruiken van levende donoren (OPU/IVP).

Tenslotte kan men ook op een bepaald moment beslissen een (mogelijke) donor te slachten. Het spreekt voor zich dat men in dit geval, mits het gebruik van een goed identificatiesysteem, de eicellen van deze op voorhand geselecteerde donoren gemakkelijk kan inzamelen in het slachthuis (Hansen, 2006). Voor commerciële doeleinden worden echter hoofdzakelijk eicellen van levende topkoeien, bekomen na OPU, gebruikt om *in vitro* embryo's te genereren. Een aspect dat daarbij gelukkig steeds meer aandacht krijgt, is het dierenwelzijn. Bij ovum pick-up gecombineerd met *in vitro* productie wordt daarbij niet meer alleen aandacht besteed aan de afwijkingen die de kalveren kunnen hebben, maar ook aan de impact van deze techniek op de reproductieve toekomst van de donoren en receptoren (McEvoy, 2006).

## ACTUELE EMBRYOPRODUCTIE IN CIJFERS

## Wereldwijd

De mate waarin geassisteerde voortplantingstechnieken worden gebruikt, verschilt tussen de verschillende werelddelen. Daarbij hoeft het bovendien niet altijd over de meest geavanceerde voortplantingstechnieken te gaan. Zo wordt bijvoorbeeld wereldwijd één vijfde van de koeien kunstmatig geïnsemineerd. Terwijl in Europa ongeveer 60% van de runderen via KI wordt bevrucht, is dit in Afrika ongeveer 2% en in Zuid-Amerika slechts ongeveer 1% (Thibier, 2005).

In Tabel 1 wordt het totaal aantal *in vivo* en *in vitro* geproduceerde embryo's wereldwijd, in Europa en Brazilië aangegeven voor het werkjaar 2004 of 2005. Wat betreft de *in vivo* embryoproductie neemt Europa ongeveer 16% van de totale productie in. Noord-Amerika is de grootste producent met 39,5% van het totaal en Zuid-Amerika en Azië zijn elk ongeveer goed voor een vijfde van de totale productie (bron: Thibier, IETS Newsletter, December 2005). Verder blijkt uit de cijfers dat 30,4%, nagenoeg één derde, van alle getransfereerde embryo's *in vitro* geproduceerd werden. Hier liggen de verhoudingen duidelijk anders (Tabel 2) waarbij op wereldschaal Azië en Zuid-Amerika ondertussen de enige belangrijke producenten zijn met een aandeel van ongeveer 2/3 en 1/3 respectievelijk. Gestimuleerd door een goed draaiende economie en hoge melkprijzen midden jaren '90, gebruikte men nochtans in Europa en Noord-Amerika op grote schaal OPU/IVP. Ondertussen hebben de concurrentie tussen de verschillende bedrijven, de gedaalde melkprijzen, een verminderd vertrouwen in de technologie en de hoge kostprijs er echter voor gezorgd dat het gebruik van OPU/IVP daalt (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006).

Terwijl in Azië het merendeel van de embryo's ingevroren wordt, worden in Zuid-Amerika bijna alleen verse embryo's overgeplant (Tabel 2). In Japan wordt IVP en ondertussen ook kloning toegepast bij de zeer dure zwarte vleesrassen (Wagyu) en China voert grote hoeveelheden IVP-embryo's in om zijn melkveestapel uit te bouwen (van Wagtendonk-de Leeuw, 2006). Het verkrijgen van cijfergegevens uit landen zoals China en India is echter niet evident (Thibier, 2005). De hoge cijfers voor Zuid-

Amerika zijn vooral het werk van Brazilië, de grootste vleesexporteur ter wereld. Dankzij een meer dan vervijfvoudiging van het totaal aantal geproduceerde embryo's in 10 jaar (Figuur 1; Baruselli *et al.*, 2005) neemt Brazilië sinds 2002 ongeveer een vierde van alle embryotransplantaties voor zijn rekening. Wat de *in vitro* productie van embryo's betreft, is het duidelijk dat Brazilië ook hier een grote wereldspeler is. Met een transfer van meer dan 80.000 OPU/IVP-embryo's in 2004, nam het een marktaandeel van 33,7% in (Tabel 1). Het gebruik van OPU/IVP werd pas eind jaren negentig in Brazilië geïntroduceerd. De grote opbrengst tijdens OPU, tot 20-30 eicellen per sessie per Nelorekoe (persoonlijke communicatie JHM Viana, Brazilië), de schaalgrootte en de lage loonkosten zorgen ervoor dat de embryotransfer in Brazilië wel rendabel is.

## Europa en België

Uit informatie van 24 van de 31 Europese landen blijkt dat het totaal aantal embryotransfers in Europa in 2005 met 5,2% gedaald is naar 93,034 transfers (Tabel 1, bron: 'Association Européenne de Transfert Embryonnaire' AETE, 2006). Het aantal transfers van *in vitro* embryo's is nochtans gestegen met 4,2% maar deze nemen slechts 6,3% van alle transfers in. Wanneer de gegevens land per land worden bekeken, blijkt dat België op de 9<sup>e</sup> plaats staat wat betreft het gebruik van MOET met 2119 getransfereerde *in vivo* geproduceerde embryo's. Er vinden echter geen commerciële OPU/IVP-sessies plaats zodat er ook geen *in vitro* embryo's worden geproduceerd voor commerciële doeleinden (Tabel 3). HG heeft gedurende de laatste 11 jaar 93 commerciële OPU-sessies uitgevoerd bij Belgisch Witblauwe (BWB) donoren waarvan 46 in de laatste 15 maanden. Uit deze sessies bij 19 donoren werden er 2,8 embryo's per sessie verkregen, waardoor OPU/IVP bij BWB een mogelijk alternatief lijkt voor MOET. Door de goede resultaten van diepgevroren IVP-embryo's uit het HG-fokprogramma stijgt het vertrouwen van de Belgische veehouders, ook bij de houders van BWB. Belgische dieren worden daarom soms in Nederland gestald om deel te nemen aan een OPU-programma waarna de embryo's in België worden ingevoerd. Ruim 10 jaar na de productie van de eerste OPU/IVF-kal-

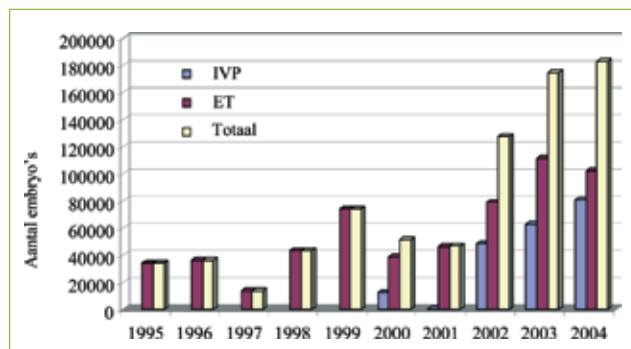
**Tabel 1. Het aantal embryotransfers en geproduceerde embryo's wereldwijd, voor Europa en Brazilië, verdeeld in *in vivo* en *in vitro* geproduceerde embryo's.**

	<i>In vivo</i> : MOET	<i>In vitro</i> : OPU/IVP	Jaar	Bron
Wereld	geproduceerd: 549 279	geproduceerd: 239 813	2004	IETS, 2005
Europa	geproduceerd: 96 581	geproduceerd: 7 399	2005	AETE, 2006
	getransfereerd: 87 218	getransfereerd : 5 816		
	(57,1 % ingevroren)	(53,8 % ingevroren)		
	16 995 spoelingen	3 764 OPU sessies		
	5,68 embryo's / spoeling	1,97 embryo's / sessie		
Brazilië	getransfereerd: 102 100	getransfereerd: 80 833	2004	Baruselli <i>et al.</i> , 2005
		12 980 donoren		
		23,8 eicellen / donor		

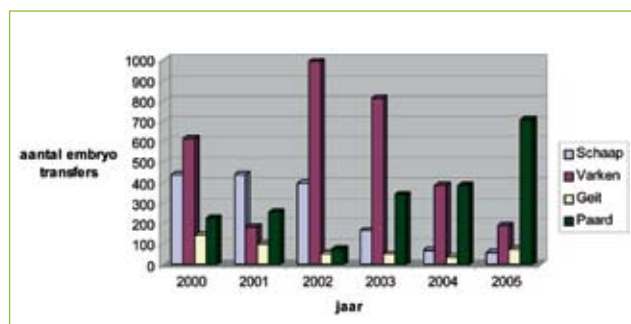


**Tabel 2. Het wereldwijd aantal *in vitro* geproduceerde embryo's, verdeeld over de verschillende continenten in 2004 (Bron: IETS, 2006).**

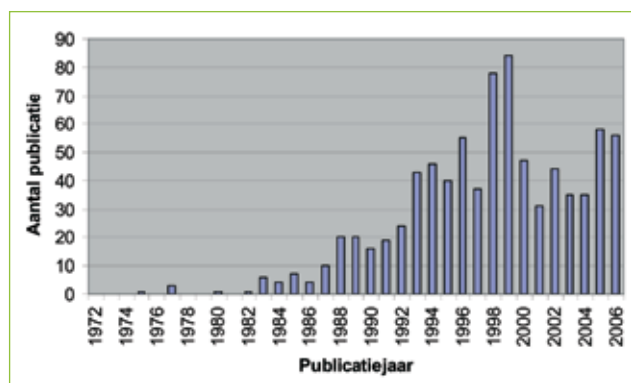
Continent	Getransfereerd		Totaal	% van totaal
	Vers	Ingevroren		
Azië	42 547	107 570	150 097	62,6
Zuid-Amerika	80 833	0	80 833	33,7
Europa	3 437	3 196	6 643	2,8
Noord-Amerika	2 070	49	2 119	0,9
Afrika	74	47	121	0,1
Oceanië	Niet gekend			
Totaal	128 951	110 862	239 813	100



**Figuur 1. Het aantal geproduceerde embryo's in Brazilië, door middel van *in vitro* (IVP) en *in vivo* productie (ET) in de periode 1995-2004 (bron: Baruselli, SBTE 2005).**



**Figuur 2. Het aantal getransfereerde embryo's van andere diersoorten in Europa in 2005 (Bron: AETE, 2006).**



**Figuur 3. Het aantal wetenschappelijke publicaties per jaar met bovine *in vitro* embryo productie in de titel, volgens de zoekrobot van 'Web of Science'. Zoekterm: TI=((invitro fertil\* OR in vitro fertil\* OR IVF OR in vitro produc\* OR IVP OR fertil\* in vitro OR fertil\* invitro) AND (cow OR bovine OR cattle) AND (oocyte\* OR embryo\*)) AND PY=1972 tot 2006.**

veren in België (Bols *et al.*, 1995) kan dus gerust gesteld worden dat ondanks het mogelijke potentieel deze technologie niet heeft geleid tot een commercieel labo dat goede resultaten boekt waarbij bovendien de kosten voor de veehouder niet te hoog zijn. Ondanks het feit dat Nederland qua dimensie en opzet van de rundveehouderij toch enigzins te vergelijken is met België wordt de techniek daar wel reeds lang gebruikt. De redenen daarvoor zijn divers maar de belangrijkste zijn uiteraard van economische aard. Alle mogelijke extra kosten die worden toegevoegd aan het (re)productieproces zijn er immers te veel aan. Een kosten-batenanalyse, waarbij de extra genetische winst wordt afgewogen tegenover de beperkte meeropbrengst, valt daarom dikwijls negatief uit.

Opmerkelijk is dat het aantal Europese landen dat zich met OPU/IVP bezig houdt, spectaculair daalt. Terwijl in de periode 1998-2001 nog 13 tot 14 Europese landen OPU gebruikten (Merton, 2005), was dit in 2005 beperkt tot slechts zeven landen. Bovendien nemen Nederland (1846 sessies) en Duitsland (1557 sessies) samen 90% van alle OPU/IVP-sessies voor hun rekening (Tabel 3). Net zoals in Nederland bij HG worden ook in Duitsland bijna alle OPU-sessies uitgevoerd door één groot bedrijf (Masterrind).

Ook het aantal embryotransfers bij andere diersoorten (schaap, varken en geit) is verminderd, alleen bij het paard ziet men een stijging (Figuur 2). Deze cijfers maken dus wel duidelijk dat het merendeel van de OPU/IVP-kalveren niet in Europa geboren wordt; een toename in het gebruik van deze techniek zal zich eerder voordoen in landen met lage loonkosten die zich volop aan het ontwikkelen zijn (Dehareng, 1999; Mapletoft en Hasler, 2005; Thibier, 2005).

**HET GEBRUIK VAN IVP IN HET WETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK**

**Bijkomende inzichten in het embryometabolisme en het belang voor de invriesbaarheid**

Het produceren van *in vitro* embryo's gebeurt niet alleen voor commerciële doeleinden. Vele laboratoria houden een IVP-systeem beschikbaar alleen uit wetenschappelijke overwegingen. Dit is onder andere af te leiden uit het aantal wetenschappelijke publicaties met betrekking tot de productie van bovine *in vitro* embryo's dat per jaar kan worden teruggevonden met de zoekrobot van 'Web

**Tabel 3. Het aantal OPU-IVP sessies in Europa in 2005 verdeeld over de verschillende landen (Bron: AETE, 2006).**

Land	Aantal	% van
	OPU-IVP sessies	totaal
Nederland	1 846	49
Duitsland	1 557	41
Italië	226	6
Frankrijk	90	2,4
Finland	31	0,8
Kroatië	8	0,2
Spanje	6	0,2
Totaal	3 764	100

of Science' (Figuur 3). Dankzij het nabootsen van de embryokweek in de proefbuis is de kennis over processen als eicelrijping of maturatie, bevruchting en de eerste delingsstadia van het embryo spectaculair toegenomen (Gordon, 2003). Toch moet hierbij steeds rekening gehouden worden met belangrijke verschillen tussen de *in vivo* en *in vitro* ontwikkeling van een embryo.

De *in vitro* embryoproductie is namelijk nog steeds slechts een ruwe imitatie van de condities die onder natuurlijke omstandigheden in de koe de embryonale ontwikkeling beheersen. Dit kan onder meer afgeleid worden uit gewijzigde genexpressiepatronen, met bijvoorbeeld een 'upregulatie' van genen die stressproteïnen reguleren - de zogenaamde 'heat shock proteins' - en een 'downregulatie' van het glucosetransporter-1 mRNA bij *in vitro* embryo's, in vergelijking met *in vivo* embryo's (Niemann en Wrenzycki, 2000). Ook het metabolisme van een embryo verloopt *in vivo* en *in vitro* niet helemaal gelijkaardig. Wanneer met behulp van gentechnologie de specifieke noden van het embryo verder ontrafeld worden, kunnen in de toekomst nog grote verbeteringen verwacht worden in het IVP-protocol (van Wagtenonk-de Leeuw, 2006).

De kennis van het onderliggende embryonale metabolisme is verder ook van zeer groot belang in het onderzoek naar het invriezen en/of de vitrificatie van *in vitro* embryo's. Het is algemeen bekend dat er daarin nog vooruitgang kan geboekt worden. Door het wijzigen van de afkoelingsnelheden en de concentratie en het soort cryoprotectantia en additieven worden de cryopreservatieprotocollen geleidelijk verbeterd, maar grote sprongen voorwaarts kunnen verwacht worden wanneer de cellen zelf zo gemodificeerd worden dat ze een betere weerstand kunnen bieden aan het invriezen. Zo zou het vetgehalte in het cytoplasma verlaagd worden door de cultivering van embryo's in aanwezigheid phenazine-ethosulfaat (PES) waardoor de embryo's beter het invriezen en vitrificeren overleven (Seidel, 2006).

### Productie van gesekste embryo's

Dankzij het onderzoek naar *in vitro* embryoproductie werden recente technieken verder ontwikkeld. Zo was men reeds langer geïnteresseerd in manieren om enkel vrouwelijke embryo's te produceren, omdat in sommige gevallen een vrouwelijk kalf meer gewenst is dan een mannelijk. Hiertoe kan een geslachtsbepaling op de embryo's zelf uitgevoerd worden. Dit is een techniek die ondertussen

al een tijdje gecommmercialiseerd is. Via embryobiopsie worden één of twee blastomeren verwijderd bij 8- tot 16-cellige embryo's en met behulp van PCR wordt het specifieke mannelijke DNA geamplificeerd. Een recente studie heeft deze geslachtsbepaling ook uitgevoerd op IVP-embryo's. Hierbij bleek geen significant verschil te bestaan tussen de drachtigheidspercentages na de transfer van gesekste (49-59%) en niet-gesekste embryo's (56-66%) (Durocher *et al.*, 2006). Bij HG, waar deze techniek commercieel wordt toegepast, bemerkt men een daling van 5 à 10% in de drachtigheidspercentages als gesekste embryo's worden gebruikt.

In de toekomst zal embryobiopsie ook meer en meer gebruikt worden om (erfelijke) aandoeningen en/of positieve eigenschappen vroegtijdig te detecteren, wat dan 'marker assisted selection' (MAS) genoemd wordt. Ondertussen zijn bij runderen duizenden 'single nucleotide polymorphisms' (SNP's) in het genoom gekend die samen het genotype van een rund bepalen. Wanneer het verwachte effect (eigenschap) van elk haplotype van deze SNP's gekend is, kan men gebruik maken van 'marker haplotypes' en kan aan een bepaald genotype een bepaalde verwachte fokwaarde gelinkt worden. Voor melkvee zijn nu chips voorhanden met meer dan 10000 SNP's (ongeveer 250 euro per stuk) en reeds commercieel beschikbare software maakt daarna een fokwaardeschatting mogelijk. Dankzij de mogelijkheid van 'genome-wide selection' is de zoektocht naar enkele waardevolle genen overbodig en kan reeds op embryo- of kalverniveau geselecteerd worden. Bovendien is de accurateheid van deze techniek veel hoger dan die van traditionele genetische selectie (Schaeffer, 2006). Onder andere de 'Animal Science Group' van Wageningen, Nederland, is de praktijkrijpheid van deze techniek aan het testen op een aantal fokbedrijven. Wanneer de selectie van waardevolle genen op deze wijze reeds bij het kalf of het embryo gebeurt, kan dit het generatie-interval drastisch verkorten (Mapletoft en Hasler, 2005; Thibier, 2005; Hansen, 2006).

Tijdens het wegnemen van blastomeren voor de biopsie bleek bovendien dat deze ongedifferentieerde embryonale cellen afzonderlijk in staat zijn om uit te groeien tot een embryo. Zo zijn er ondertussen twee technieken ontwikkeld om uit één embryo meerdere identieke kalveren te bekomen. Een eerste is de bisectie of het klieven van een embryo door middel van een stalen microchirurgisch mes. Na het klieven van *in vitro* morula's en blastocysten werd duidelijk dat embryo's bekomen na 1 keer klieven (demi-embryo's) beter overleven dan embryo's die 2 keer werden gekliefd (quarter-embryo's) (Rho *et al.*, 1998). De tweede techniek bestaat uit het verzamelen van blastomeren met behulp van een micromanipulator. Midden jaren negentig werden op deze wijze 4 monozygotische kalveren geboren na het plaatsen van de 4 blastomeren van een 4-cellig *in vitro* embryo in een surrogate zona pellucida. Na cultuur tot 5 dagen werden de embryo's per 2 getransfereerd, waaruit dan twee tweelingen maar 4 genetisch identieke kalveren geboren werden (Johnson *et al.*, 1995).

Een nieuwere techniek om tot kalveren van het gewenste geslacht te komen, is het sperma seksen of sorteren in X-dragende en Y-dragende zaadcellen. Dit gebeurt via flowcytometrie, waarbij dan het gesekest sperma kan gebruikt worden, ofwel voor kunstmatige inseminatie

ofwel in het laboratorium voor *in vitro* fertilisatie. Zowel *in vivo* als *in vitro* gebruikt gesekst sperma heeft een verlaagde vruchtbaarheid. In een recente studie waarin gesekst sperma geïnsemineerd werd, werd een drachtigheidspercentage van 21% gerapporteerd, waarbij 82% van de kalveren vrouwelijk was, terwijl met 'normaal' sperma 46% van de koeien drachtig werd met 49% vrouwelijke nakomelingen (Andersson *et al.*, 2006). Ook *in vitro* worden lagere blastocystpercentages genoteerd na de fertilisatie met gesekst sperma dan bij niet-gesorteerd sperma. Bij de groep van Wilson *et al.* (2006) was dit bijvoorbeeld 12,2 en 20,1% respectievelijk. Na de transplantie van deze met gesekst sperma geproduceerde embryo's werd een drachtigheidpercentage van 34,2% bekomen bij vaarzen terwijl slechts 18,2% van de lacterende koeien drachtig werd na ET. Bij de geboorte bleek 92,5% van de kalveren vrouwelijk te zijn.

### Verbetering van *in vitro* embryoproductiesystemen

Men streeft terecht naar nog betere IVP-protocols en wanneer meer IVP-embryo's overleven en aanleiding geven tot normale drachten kan verwacht worden dat de commerciële vraag naar IVP-embryo's zal toenemen (van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2000). Hierbij zal vooral het verbeteren van de invriesbaarheid cruciaal zijn (zie hoger). Hoewel voor OPU in de nabije toekomst geen grote verbeteringen meer verwacht moeten worden (van Wagendonk-de Leeuw, 2006), zal de toepassing van de techniek in de toekomst toch een zeker belang blijven behouden en wel wegens zijn mogelijk repetitief karakter. Zo kunnen herhaaldelijk en tot meer dan een jaar eicellen verzameld worden bij eenzelfde donorkoe waardoor studies in de tijd kunnen verricht worden en er in totaal meer eicellen per koe gecollecteerd worden (Thibier, 2005). Dit kan voor rassen met een enge genetische basis van zeer groot belang zijn, omdat de eicellen van één koe bovendien in de proefbuis kunnen gecombineerd worden met het sperma van verschillende stieren. Dit levert een aanzienlijke flexibiliteit op naar de genetische selectie toe. De snelheid van de genetische vooruitgang is gebaat met OPU/IVP. Er kunnen immers embryo's gegenereerd worden tijdens de dracht, en op het moment dat een koe haar eerste lactatiecijfers produceert, kunnen er al meerdere kalveren geboren worden.

De beste manier om vernieuwde technieken in de geassisteerde voortplanting te beoordelen, is de *in vitro* geproduceerde embryo's overplanten in receptoren en de dracht en geboorte van een gezond kalf afwachten. Dit vergt echter zeer veel tijd en middelen. Het is ook in dit verband dat de beperkte implementatie van de IVP in Vlaanderen moet worden gesitueerd. Zo is er om het gebruik van IVP commercieel interessant te maken een minimale schaalgrootte vereist waarbij donoren gegroepeerd rond vergelijkbare foktechnische doelstellingen (vlees of melk), gecentraliseerd worden in een selectiecentrum. In Nederland worden zo dieren in groep geprikt (15 tot 20 sessies op één ochtend) en embryo's in bepaalde batches geproduceerd. Bij particulieren worden daarentegen de donoren op het bedrijf van de veehouder zelf gepuncteerd.

Om het mogelijk te maken dat de IVP-embryo's vers worden overgeplant, is een zeer grote voorraad van mo-

gelijke receptoren nodig. Het houden en monitoren van zo'n grote kudde ontvangsters kosten handenvol geld. Dit wordt economisch pas rendabel wanneer het op grote schaal kan worden georganiseerd. Bij HG wordt 60 tot 80% van de embryo's ingevroren en worden de embryo's ofwel verkocht met terugkooprecht, ofwel wordt een contract met de veehouders opgesteld waarbij ze ontvangsters ter beschikking stellen en ze per geleverde dracht betaald worden. Zelfs in Noord-Amerika, waar deze technieken in het verleden 'massaal' commercieel aan de rundveehouders werden aangeboden, blijven nu slechts een handvol actieve bedrijven over. In Europa is het de kostprijs van een dermate grootschalige operatie die de implementatie ervan in de weg staat. Verder zijn er cultuurverschillen en verschillen in foktechnische doelstellingen die de markt erg fragmenteren. Uiteraard speelt ook de economische toestand in de rundveesector een belangrijke rol, met daarbij een verplaatsing van de productie naar Latijns-Amerika en in de toekomst waarschijnlijk ook naar Azië. Dit alles brengt met zich mee dat de finale stap naar de evaluatie van de embryokwaliteit in een IVP-systeem, namelijk het overplanten naar ontvangsters, dikwijls niet kan worden gezet. Voor universiteiten met beperkte mogelijkheden is daarom het samenwerken met commerciële bedrijven aangewezen. Daarenboven is er nood aan betrouwbare kwaliteitsparameters die reeds *in vitro* de embryokwaliteit adequaat kunnen bepalen. Bovendien bestaan er grote individuele donorkoe- en stiersverschillen met betrekking tot de ontwikkelingscompetentie van IVP-embryo's; tevens kunnen de receptoren een aardige bijdrage leveren tot de variabiliteit in de drachtigheidsresultaten na ET van IVP-embryo's. Het uitschakelen van deze invloeden is een reden meer om te zoeken naar goede '*in vitro* markers' (McMillian, 1998; De Roover *et al.*, 2003; Palma en Sinowatz 2004; Hansen, 2006).

### CONCLUSIES

Concluderend kan gesteld worden dat OPU/IVP nog steeds frequent wordt gebruikt, zowel commercieel als in het kader van het wetenschappelijk onderzoek. Commercieel gezien is vooral het grote en stijgende aantal getransplanteerde embryo's in Azië en Zuid-Amerika opmerkelijk, terwijl in Europa steeds minder landen OPU/IVP-kalveren produceren. Wat het wetenschappelijk onderzoek betreft, lijkt de productie van *in vitro* embryo's nog steeds beloftevol: niet alleen voor de optimalisatie van de techniek maar vooral ook voor de (verdere) ontwikkeling van nieuwe(re), aan IVP verbonden, (onderzoeks- en preservatie-) technieken.

### GESELECTEERDE LITERATUUR

- Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development* 61, 57-66.
- AETE Association Européenne de Transfert Embryonnaire (2006) September 08<sup>th</sup>-09<sup>th</sup> 2006 Zug/Switzerland.



- Al-Katanani Y.M., Drost M., Monson R.L., Rutledge J.J., Kriinger III C.E., Block J., Thatcher W.W., Hansen P.J. (2002). Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified produced embryos in lactating dairy cows under heat stressed conditions. *Theriogenology* 58, 171-182.
- Andersson M., Japone J., Kommeri M., Dahlbom M. (2006). Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian Cows after Artificial Insemination with sexed sperm. *Reproduction of Domestic Animals* 41, 95-97.
- Baruselli P.S., de Sa Filho M.F., Martins C.M., Nasser L.F., Nogueira M.F.G., Barros C.M., Bó G.A. (2005). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. XIX Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) – 25-28 Aug 2005, Angra dos Reis, Brazil.
- Boerjan M.L., den Haas J.G.H., Dieleman S.J. (2000). Embryonic origins of health: long term effects of IVF in human and livestock. *Theriogenology* 53, 537-547.
- Bols P.E.J. (2005). Puncture of immature follicles in bovine assisted reproduction. *Verhandelingen van de Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* 67, 177-202.
- Bols P.E.J., Van Soom A., de Kruif A. (1994). Ovum pick-up (OPU) bij het rund. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 63, 101-108.
- Bols P.E.J., Van Soom A., de Kruif A. (1996). Gebruik van de transvaginale ovum pick-up (OPU) techniek: geboorte van de eerste OPU-kalveren in België. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 65, 86-91.
- Bols P.E.J., Vandenheede J.M.M., Van Soom A., de Kruif A. (1995). Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43, 677-687.
- Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L., Donawick W.J., Evans J.F., Dressel M.A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction* 27, 147-158.
- Butler W.R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in post partum dairy cows. *Livestock Production Science* 83, 211-218.
- Chaubal S.A., Molina J.A., Ohlrichs C.L., Ferre L.B., Faber D.C., Bols P.E.J., Riesen J.W., Tian X., Yang X. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65, 1631-1648.
- De Roover R., Genicot G., Leonard S., Bols P., Dessy F. (2005). Ovum pick-up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science* 86, 13-25.
- De Roover R., Genicot G., Leonard S., Denis E., Feugang J.M., Bols P.E.J., Massip A., Dessy F. (2003). Vier jaar ovum pick-up (OPU) en *in vitro* fertilisatie (IVF) bij donoren van het Belgisch Witblauw ras. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 72, 348-358.
- Dehareng D., Annet C., Dupont F., Goffin L., De Roover R., Hanzen C.H., Massip A., Dessy F., Thonon A. (1999). Les conditions de la rentabilité de la production d'embryons bovins par ponction folliculaire écho-guidée et fécondation *in vitro* en région wallonne: Première approche. *Annales de médecine vétérinaire* 143, 415-422.
- Durocher J., Morin N., Blondin P. (2006). Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology* 65, 102-115.
- Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. (2006). Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65, 178-191.
- Fukuda Y., Ichikawa M., Toyoda Y. (1990). Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biology of Reproduction* 42, 114-119.
- Gordon I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos*. Second Edition. CABI publishing, Oxon, UK – Cambridge, USA.
- Hansen P.J. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle - an overview. *Theriogenology* 65, 119-125.
- Hasler J.F. (2000). In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction* 15, 47-58.
- Hasler J.F. (2006). The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology* 65, 4-16.
- Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.Q., McCauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J.E., Trimmer S.A. (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43, 141-152.
- IETS Newsletter (International Embryo Transfer Society), December 2005, Thibier M.
- Johnson W.H., Loskutoff N.M., Plante Y., Betteridge K.J. (1995). Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo. *The Veterinary Record* 137, 15-16.
- Kauffold J., Amer H.A.H., Bergfeld U., Müller F., Weber W., Sobiraj A. (2005). Offspring from non-stimulated calves at an age younger than two months: a preliminary report. *Journal of Reproduction and Development* 51, 527-532.
- Kruip Th. A.M., den Daas J.H.G. (1997). In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47, 43-52.
- Leroy J.L.M.R., de Kruif A. 2006. Reduced reproductive performance in high producing dairy cows: is there actually a problem? *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 75, 55-60. Speciaal volume.
- Leroy J.L.M.R., Genicot G., Donnay I., Van Soom A. (2005a). Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reproduction in Domestic Animals* 40, 76-78.
- Leroy J.L.M.R., Opsomer G., De Vlieger S., Vanholder T., Goossens L., Geldhof A., Bols P.E.J., de Kruif A., Van Soom A. (2005b). Comparison of embryo quality in high yielding dairy cows, in dairy heifers and beef cows. *Theriogenology* 64, 2022-2036.
- Looney C.R. (1986). Superovulation in beef females. Proc. 5<sup>th</sup> Ann. Conv. AETA, Forth Worth, Texas, pp. 16-29.
- Lu K.H., Gordon I., Gallagher M., McGovern H. (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. *The Veterinary Record* 121, 159-160.
- Mapletoft R.J., Benett Stewart K., Adams G.P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 42, 601-611.
- Mapletoft R.J., Hasler J.F. (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 24, 393-403.
- Mapletoft R.J., Stookey J. (1998). General sanitary procedures and welfare considerations associated with in vivo production of embryos. In: *Manual of the International Embryo Transfer Society* 3rd edition, Eds DA Stringfellow and SM Seidel, Chapter 4, p 55-66.
- McEvoy T.G., Alink F.M., Moreira V.C., Watt R.G., Powell K.A. (2006). Embryo technologies and animal health – consequences for the animal following ovum pick-up, in

- vitro embryo production and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 65, 926-942.
- McMillian W.H. (1998). Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. *Theriogenology* 50, 1053-1070.
- Merton J.S., de Roos A.P.W., Mullaart E., de Ruigh L., Daal L., Vos P.L.A.M., Dieleman S.J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. *Theriogenology* 59, 651-674.
- Merton J.S., Landman B., Mullaart E. (2005). Effect of cysteamine during *in vitro* maturation of OPU derived bovine oocytes on further *in vitro* embryonic development and pregnancy rate. *Reproduction, Fertility and Development* 18, 251.
- Merton S. (2005). European statistical data of bovine embryo transfer activity in 2004. A.E.T.E. Newsletter n° 24, December 2005, p 13-14. Online: [www.fbn-dummerstorf.de/aete/nl1205.pdf](http://www.fbn-dummerstorf.de/aete/nl1205.pdf)
- Nibart M., Marquant-Le Guienne B., Humblot P. (1998). General sanitary procedures associated with *in vitro* production of embryos. In: *Manual of the International Embryo Transfer Society* 3<sup>rd</sup> Edition, Eds DA Stringfellow and SM Seidel, Chapter 5, p 67-77.
- Niemann H., Wrenzycki C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53, 21-34.
- Palma G.A., Sinowatz F. (2004). Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. *Anatomia Histologia Embryologia* 33, 257-262.
- Pieterse M.C., Kappen K.A., Kruip T.A.M., Taverne M.A.M. (1988). Aspiration of bovine oocytes during trans-vaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30, 751-762.
- Reis A., Rooke J.A., McCallum G.J., Staines M.E., Ewen M., Lomax M.A., McEvoy T.G. (2003). Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development* 15, 275-284.
- Rho G.-J., Johnson W.H., Betteridge K.J. (1998). Cellular composition and viability of demi- en quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* 50, 885-895.
- Rizos D., Gutierrez-Adan A., Perez-Garnelo S., De La Fuente J., Boland M.P., Lonergan P. (2003). Bovine embryo culture in the presence of absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction* 68, 236-243.
- Sartori R., Sartor-Bergfelt R., Mertens S.A., Guenther J.N., Parrish J.J., Wiltbank M.C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* 85, 2803-2812.
- Scheiffer L.R. (2006). Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123, 218-223.
- Seidel G.E.Jr. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65, 228-235.
- Stepoe P.C., Edwards R.G. (1978). Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2, 366.
- Taneja M., Bols P.E.J., Van de Velde A., Ju J.-C., Schreiber D., Tripp M.W., Levine H., Echelard Y., Riesen J., Yang X. (2000). Developmental competence of juvenile calve oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biology of Reproduction* 62, 206-213.
- Thibier M. (2005). The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reproduction, Nutrition and Development* 45, 235-242.
- Thibier M. (2006). Biosecurity and the various types of embryos transferred. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 260-267.
- van Arendonk J.A.M., Bijma P. (2006). Factors affecting commercial application of embryo technologies in dairy cattle in Europe—a modelling approach. *Theriogenology* 59, 635-649.
- Van Soom A., Bols P.E.J., Vanroose G., de Kruif A. (1997). Steriliteit bij hoogwaardige runderen: kans op nakomeling blijft gewaarborgd dankzij *in vitro* fertilisatie. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 66, 286-293.
- Van Soom A., Mijten P., Van Vlaenderen I., Van den Branden J., Mahmoudzadeh A.R., de Kruif A. (1994). Birth of double-muscle Belgian Blue calves after transfer of *in vitro* produced embryos into dairy cattle. *Theriogenology* 41, 855-867.
- van Wagendonk-de Leeuw A.M. (2006). Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65, 914-925.
- van Wagendonk-de Leeuw A.M., Aerts B.J.G., den Haas J.H.G. (1998). Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49, 883-894.
- van Wagendonk-de Leeuw A.M., Mullaart E., de Roos A.P., Merton J.S., den Haas J.H.G., Kemp B., de Ruigh L. (2000). Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53, 575-597.
- Wilson R.D., Fricke P.M., Leibfried-Rutledge M.L., Rutledge J.J., Syverson Penfield C.M., Weigel K.A. (2006). *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 65, 1007-1015.
- Wiltbank M.C., Sartori R., Lopez H., Haughian J.M., Fricke P.M., Gumen A. (2001). Novel effects of nutrition on reproduction in lactating cows. *Journal of Dairy Science Supplement* 84, 32.