

## DE (GEASSISTEERDE) VOORTPLANTING BIJ DE GEDOMESTICEERDE GEIT (*CAPRA HIRCUS*)

T. van Bergen, J.M.J. Aerts, I.G.F. Goovaerts, P.E.J. Bols

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

### SAMENVATTING

De geit en de geitenhouderij nemen op wereldschaal een belangrijke plaats in binnen de dierlijke productie, waarbij de aantallen en uitbatingsprincipes regionaal zeer sterk verschillen. In onze streken worden geiten commercieel vooral gehouden voor de productie van geitenkaas waarbij het aantal dieren en bedrijven echter te klein is om van grote economische betekenis te zijn. Typisch voor de geit is de seizoengebonden reproductie, die een grote invloed heeft op alle vormen van geassisteerde voortplanting. Omdat de bronstwaarneming bij de geit niet altijd evident is, gebruikt men in de commerciële geitenhouderij veel inductie en synchronisatie van de oestrus in combinatie met kunstmatige inseminatie (KI) op vastgestelde tijdstippen zodat de noodzaak van bronstwaarneming tot een minimum wordt herleid. Net zoals bij het rund worden ook bij de geit, met wisselend succes, meer geavanceerde technieken uit de geassisteerde voortplanting toegepast, gaande van superovulatie en embryotransplantatie tot het invriezen van sperma en embryo's en *in vitro* embryoproductie. Hierbij dient alvast te worden opgemerkt dat deze moderne voortplantingstechnieken, meer nog dan bij het rund, door hun hoge kostprijs gereserveerd blijven voor de absolute 'genetische' top van de geitenpopulatie. In dit overzichtsartikel worden in eerste instantie de normale voortplantingskarakteristieken bij de geit besproken. Daarna wordt dieper ingegaan op de mogelijkheden en de beperkingen van de toepassing van technieken uit de geassisteerde voortplanting.

### INLEIDING

In bergachtige, West-Aziatische gebieden is de geit reeds gedomesticeerd sinds 9000 vóór Christus. Onze tamme geiten zouden afstammen van de wilde Bezoargeit (*Capra aegagrus*). De meeste actuele soorten beschikken over een zeer groot klimatologisch adaptatievermogen, waarbij ze even goed gedijen in koude gebieden, zoals Scandinavië, in gure, bergachtige streken in Centraal-Europa en Azië, in gematigde subtropische regio's, zoals het mediterrane gebied, als in tropische continenten, zoals Afrika en Latijns-Amerika. Geiten zijn individueel ingestelde dieren met vaak een grillig en wispelturig karakter. De economische redenen waarom ze gehouden worden, verschillen sterk van streek tot streek: melk, vlees, huid en/of wol. In onze gebieden worden geiten vooral gehouden als gezelschapsdier en voor de melkwinning in gespecialiseerde geitenhouderijen. De huid levert fijn leder op dat altijd soepel blijft. Geitenvlees wordt vooral geconsumeerd in Afrika en Azië, waar de geit een zeer belangrijke bron van dierlijk eiwit is. Het uitslachtingspercentage bedraagt ongeveer 60%, wat aanzienlijk hoger is dan bij het schaap. Het vetgehalte van geitenkarkassen is lager dan bij andere herkauwers.

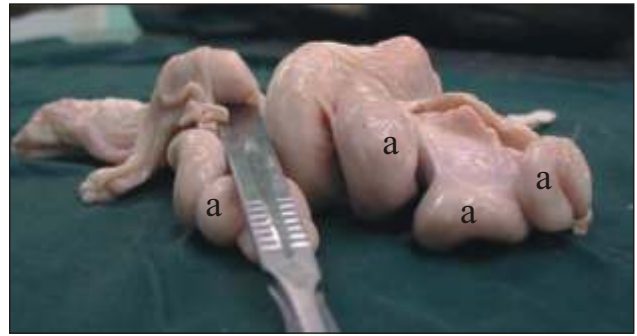
In gebieden met een intensieve veehouderij werden geiten verdrongen door rundvee. Bovendien blijkt het interessanter om in plaats van geiten melkschapen te houden, omdat die ook slachtlammeren en veel meer wol voortbrengen. Desalniettemin neemt de interesse in de geitenhouderij toe, zowel als alternatieve veehouderijvorm als door de toegenomen vraag naar geitenkaas. De geit is een zeer goede melkgeefster. In ideale omstandigheden lammert een eerstelingsgeit af op een leeftijd van ongeveer 12 maanden, waarna ze een lactatie van 9 tot 10 maanden kan aanvatten. Dit is veel langer dan bij het schaap. Een goede melkgeit kan tot 25 maal haar gewicht in melk produceren per lactatie. De melkopbrengst varieert van ras tot ras en ligt tussen 1000 en 2500 kg per lactatie, met topproducties tot 3500 kg. De melksamenstelling is minder rijk dan bij het schaap, met een melkvetpercentage van gemiddeld 4% en 3% eiwit. De derde lactatie is veelal de meest productieve. In België werden in 2004 zo'n 26 000 geiten aangehouden (cijfers Nationaal Instituut voor Statistiek), verdeeld over een duizendtal bedrijven, wat overeenkomt met een gemiddelde koppelgrootte van 26 dieren. Een belangrijk deel van de geitenhouderij in België situeert zich in de hobbysector. In een groot veeteeltland als Frankrijk worden meer dan 1.000.000 melkgeiten

gehouden in gespecialiseerde bedrijven van 100 tot 500 dieren. De nadruk ligt hierbij op de productie van enkele gepatenteerde geitenkaassoorten. Door gebruik te maken van een aantal technieken uit de geassisteerde voortplanting, zoals kunstmatige inseminatie (KI), konden landen als Frankrijk maar ook Zwitserland, Nederland en Engeland, de veredeling van de melkgeitenrassen sterk opdrijven. In dit kader situeert zich ook de toegenomen interesse in meer geavanceerde technieken uit de geassisteerde voortplanting, zoals embryotransplantatie (ET) en *in vitro* embryoproductie (IVP). De geit biedt daarbij een aantal belangrijke voordelen tegenover het rund, waardoor ze ook als modeldier in het onderzoek kan gebruikt worden. Geiten zijn veel beter handelbaar dan koeien, kunnen gedeeltelijk extensief worden gehouden en stellen veel minder hoge eisen aan opstalling en voederkwaliteit. Ze hebben een korter generatie-interval en zijn bovendien multipaar, wat extra mogelijkheden biedt in de veredeling en de selectie. Geiten hebben echter het grote nadeel dat het seizoenkwekers zijn, waarbij de voortplantingsactiviteiten plaatsvinden tijdens de perioden met korte daglengte. Dit nadeel is één van de belangrijkste indicaties voor de uitbouw van kweekprogramma's die gebruik maken van geassisteerde voortplantingstechnieken met de bedoeling het voortplantingsseizoen te beïnvloeden en de productie op te drijven.

Dit artikel geeft een overzicht van de voornaamste karakteristieken van de voortplanting bij de geit. Daarnaast worden de mogelijkheden aangegeven van de meer courante voortplantingstechnieken, zoals KI en ET, maar ook de meer geavanceerde, zoals *in vitro* embryoproductie.

#### ANATOMIE VAN HET GESLACHTSAPPARAAT BIJ DE GEIT

De geit heeft een uterus bicornus, waarbij beide hoornen verbonden zijn via een corpus uteri. Net zoals bij de koe liggen de uterushoornen gekruld naaronder toe, maar bij de geit zijn ze naar verhouding langer en daardoor meer opgekruld (Figuur 1). De lange hoornen geven de uterus en de ovaria ook meer bewegingsvrijheid in de buikholte waardoor ze zelfs bij het niet-drachtig dier diep in de buikholte kunnen wegzakken. De grootte van de ovaria varieert naargelang de intensiteit van de reproductieve activiteit en is afhankelijk van de eventuele toediening van exogene gonadotrofinen, van één tot enkele centimeters. De uterus en de ovaria zijn via een breed ligament aan de dorsale lichaamswand bevestigd. Het gedeelte van dit ligament dat naar de uterus loopt (mesometrium) hecht aan in de curvatura minor van de uterus. De arteria ovarica verlaat de aorta en loopt door het mesova-



**Figuur 1.** Geslachtsapparaat van de geit op een anatomisch preparaat. Hierbij zijn duidelijk de sterk gekrulde hoornen van de uterus (a) waar te nemen. Het handvat van het scalpel wijst de bursa ovarica aan.

rium naar het ovarium. De uterus wordt van bloed voorzien door de arteria uterina én door een aftakking van de arteriae vaginales. De cervix van de geit is opgebouwd uit stevige overlappende ringen die tijdens de oestrus relaxeren. De vagina loopt van de cervix tot het orificium urethrale, waaronder zich een suburethraal diverticulum bevindt. Het vestibulum vaginae strekt zich uit vanaf het orificium urethrale tot de vagina.

#### BELANGRIJKE REPRODUCTIEKARAKTERISTIEKEN BIJ DE GEIT

De geit is een seizoenkweker die in gematigde streken polyoestrisch is, wat betekent dat zij meerdere oestruele cycli doorloopt per voortplantingsseizoen. In het noordelijk halfrond zijn de meeste geiten anoestrisch van maart tot augustus. Het oestrusseizoen wordt voornamelijk beïnvloed door de afname van de daglengte in de nazomer, door de temperatuur, de voeding en de aanwezigheid van een bok, die synchroon ook een reactivering van zijn reproductieve activiteit doormaakt. In tropische gebieden met een geringere variatie in de daglichtlengte kunnen geiten zich het hele jaar door voortplanten. Het hormoon melatonine speelt een belangrijke rol bij deze seizoensgebonden voortplanting. Het wordt als chemische boodschapper door de epifyse gesynthetiseerd en laat seizoenkwekers toe de daglichtveranderingen waar te nemen en te verwerken. Zodoende worden neurologische prikkels (daglichtlengte) omgezet in hormonale signalen die op hun beurt inwerken op de secretie van gonadotropine releasing hormoon (GnRH). Bij het afnemen van de daglichtlengte neemt de melatoninesecretie in de epifyse bij geiten en schapen toe. Geiten zijn ongeveer geslachtsrijp op een leeftijd van 5 maanden. Bij de eerste dekking hebben bokken een leeftijd van 4 tot 6 maanden en zijn de geiten tussen 7 en 18 maanden (Angorageit). De draagtijd bij de geit bedraagt gemiddeld 150 dagen, met een variatie van 145 tot 156 dagen.

In tegenstelling tot het schaap, waarbij de oestruele cyclus 17 dagen in beslag neemt, duurt de cyclus bij de geit 19 tot 21 dagen. Korte, anovulatoire cycli van ongeveer 7 dagen komen normaal voor in het begin en op het einde van het voortplantingsseizoen. Ook nullipare dieren vertonen korte cycli in hun eerste voortplantingsseizoen. Stress kan een verkorting van de cycli veroorzaken die waarschijnlijk te wijten is aan een premature regressie van het corpus luteum. Daarom moeten geiten die tijdens een voortplantingsprogramma bij elkaar worden gebracht, minstens drie maanden van te voren gegroepeerd worden. Verder bestaan er ook rasverschillen in cyclusduur. Zo hebben Pygmygeiten een cyclus die gemiddeld langer duurt (18-24 dagen). De duur van de oestrus kan bij geiten variëren van 24 tot 96 uur, met een normale duur van 36 tot 40 uur. Een geit ovuleert 24 tot 48 uur na de start van de oestrus. Het aantal ovulaties per cyclus bedraagt 2 tot 3. Tweelingdracht en meerlingdracht komen daardoor veel frequenter voor dan bij het rund. De levensduur van een normaal CL is ongeveer 16 dagen.

#### FOLLICULAIRE DYNAMIEK EN ENDOCRIENE PROFIELEN

Bij het beschrijven van de cyclus wordt de dag van de ovulatie aangeduid als "dag 0". Net zoals bij het rund wordt ook bij de geit de folliculaire dynamiek bestudeerd met behulp van transrectale echografie. Daar waar er bij de koe sprake is van twee tot drie folliculaire groeigolven per cyclus worden er bij de geit vier groeigolven waargenomen. De ovulatie grijpt plaats bij een follikel waarvan de groei tijdens de vierde folliculaire golf begonnen is. Zo vallen de pieken van de groeigolven, waarbij de follikels dus een maximale diameter van 6 mm of meer bereiken, respectievelijk op dagen 0, 4, 8 en 14 van de cyclus. De maximale diameter van de dominante follikels tijdens deze piekmomenten ligt tussen  $7,2 \pm 0,2$  en  $9,7 \pm 0,3$  mm. Eén tot 5 dagen na het verschijnen van de laatste groeigolf treedt luteolyse op. Zo bestrijkt de luteale fase van de cyclus de periode van dag 1 tot ongeveer dag 16. Alle follikels van de voorgaande golf zijn geregresseerd of gestopt met groeien op de dag van de luteolyse. Het fenomeen van folliculaire dominantie is echter moeilijk te bestuderen bij de geit, enerzijds omwille van de duidelijke aanwezigheid van folliculaire dominantie bij de ene, maar niet bij de andere groeigolf, anderzijds ook omdat de aanwezigheid van twee dominante follikels per golf veel voorkomt. In tegenstelling tot bij het rund verschijnt een nieuwe groeigolf bij de geit reeds op het moment dat de grootste follikel van de voorgaande golf nog aan het groeien is of zijn grootste diameter heeft bereikt. Daarom

kan gesteld worden dat folliculaire dominantie in het algemeen minder sterk en frequent aanwezig is bij geiten dan bij koeien. Bovendien vertonen niet alle geiten het typische "viergolvenpatroon".

Naast de ovariële dynamiek werden bij de geit ook endocriene profielen bestudeerd door dagelijkse bloedafname waarbij de oestradiol- en progesterongehalten werden bepaald. De oestradiolconcentratie stijgt vanaf de dag van de ovulatie ( $2,7 \pm 0,3$  pg/ml) tot dag 2 ( $7,6 \pm 0,9$  pg/ml) om dan terug te dalen naar de basale waarden rond dag 5. Na deze eerste oestradiolpiek blijft het oestradiolgehalte laag gedurende de rest van de luteale fase ( $< 3$  pg/ml). Het oestradiolgehalte stijgt pas aanzienlijk wanneer de progesteronconcentratie daalt door de luteolyse rond dag 16 met een nieuwe oestradiolpiek twee dagen vóór de volgende ovulatie ( $16,5 \pm 2,4$  pg/ml). Een functioneel corpus luteum (CL) kan vanaf drie dagen na de ovulatie met transrectale echografie worden gedetecteerd. Een volwassen CL wordt waargenomen als een grijze echogene structuur met gemarkeerde grenzen en met een gemiddelde maximale diameter van  $13,5 \pm 0,8$  mm tussen dag 8 en dag 14 van de cyclus. Net zoals bij het rund komen in het CL luteale holten voor die gevuld zijn met vocht en verder geen negatief effect hebben op de progesteronconcentraties. De luteolyse, die ook bij de geit wordt veroorzaakt door  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , kan echografisch worden vastgesteld rond dag 16, die ook de eerste dag is waarop een significante daling van de progesteronconcentratie kan worden vastgesteld (van  $6,6 \pm 0,5$  ng/ml op dag 15 naar  $3,7 \pm 0,6$  ng/ml op dag 17). Bij geiten met vier folliculaire golven stijgt het progesterongehalte constant vanaf dag 1 van de cyclus en piekt het op dag 10. Bij geiten met minder folliculaire golven wordt een bifasische progesteronstijging vastgesteld, met een graduele stijging van dag 1 tot 7 en een sterke toename van dag 8 tot dag 10. Zowel de folliculaire dominantie als de oestradiolproductie verschilt tussen de folliculaire golven. Tijdens de eerste én de ovulatoire (laatste) golf wordt er actief oestradiol geproduceerd en domineren de grote follikels de overige follikels van dezelfde golf. De midluteale folliculaire golven produceren geen oestradiol en het dominantiefenomeen kan hier niet worden aangetoond, wat verklaard zou kunnen worden door het verschil in progesteronconcentratie tijdens de ontwikkeling van de desbetreffende groeigolf. Verhoogde progesteronconcentraties bevorderen folliculaire turnover en een afname van de groei van grote follikels, wat op zijn beurt de opkomst van een nieuwe golf in de hand werkt. Progesteron onderdrukt via een negatief feedbackmechanisme op de hypothalamo-hypofysaire as, de secretie van luteïniserend hormoon (LH). Op het moment van de luteolyse



valt het "progesteronblok" weg en komt de synergistische werking van follikel stimulerend hormoon (FSH) en LH tot uiting. De grote groeiende follikel produceert dan een grote hoeveelheid oestradiol en inhibine A en domineert zo de andere follikels. Via de negatieve feedback daalt het FSH-gehalte door de gestegen oestradiolconcentraties, wat nefast is voor de ondergeschikte follikels. In dit stadium kan echter de dominante follikel onder LH-invloed verder uitgroeien tot er ovulatie optreedt.

## OESTRUSSYMPTOMEN

De oestrussymptomen bij geiten zijn niet altijd even makkelijk waar te nemen. De meest opvallende veranderingen bij dieren die in oestrus komen, zijn het zwiepen met de staart, het frequent mekkeren, het urineren in aanwezigheid van een bok, de zwelling van de vulva en een muceuze vaginale uitvloeï. Al deze symptomen worden over het algemeen versterkt tot expressie gebracht in aanwezigheid van (de geur van) een bok. Het al of niet in oestrus zijn, kan ook worden vastgesteld door vaginaal onderzoek met behulp van een speculum. Bij het begin van de oestrus verandert de kleur van de cervixmucosa van wit naar hyperemisch en het secreet is dun en helder. Het dikt vervolgens snel in en wordt wit-grijsachtig en accumuleert op de bodem van de vagina. In tegenstelling tot koeien blijven geiten niet "staan" voor andere geiten wanneer ze in oestrus zijn. Het bespringen van andere geiten wijst eerder op dominantie of nymfomaan gedrag ten gevolge van cysteuzen ovariële follikels. Een geit "staat" enkel om besprongen te worden door de bok als ze echt in oestrus is. Jonge bokken zullen snel gefixeerde geiten bespringen die niet echt in "staande oestrus" verkeren. Bokken met meer ervaring vertonen dit gedrag niet. Bij melkgeiten stijgt de melkgift vanaf 8 tot 12 uur vóór de aanvang van de oestrus om tijdens de oestrus beneden de normale productie terug te vallen. Als de bok vrije uitloop heeft tussen de geiten wordt hij het beste van een stempelkussen voorzien. Verder kan ook een gevasectomiseerde "teaser bok" met stempelkussen gebruikt worden om de geiten in oestrus te merken. Deze geiten worden dan uiteraard niet bevrucht maar de 'teaser' duidt aan welke geiten in aanmerking komen om gedekt te worden door een superieure bok of in aanmerking komen voor KI.

## GEBRUIK VAN TRANSRECTALE ULTRASONOGRAFIE

Gezien het kleinere bekken van de geit is het gebruik van transrectale echografie veel minder evident dan bij

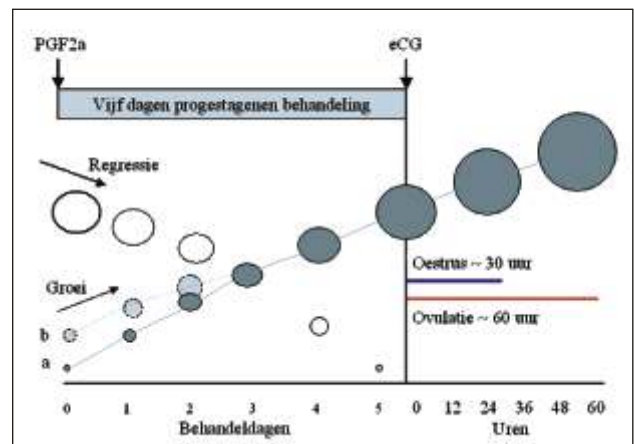
het rund. Omdat deze techniek echter het grote voordeel heeft weinig invasief te zijn, werd ook bij de geit de accuraatheid van transrectale realtime-ultrasonografie (RTU) onderzocht. De resultaten werden vergeleken met die verkregen via laparoscopie, laparotomie en uiteindelijk met de resultaten waargenomen bij het versnijden van de ovaria na ovariectomie. Voor het echografisch onderzoek werd gebruik gemaakt van een lineaire 7,5 MHz-probe, die oorspronkelijk werd ontwikkeld voor humaan prostaatonderzoek. De RTU-procedure werd verricht bij de staande geit waarbij de probe rectaal werd ingebracht, beschermd door een plastic handschoen en bedekt met vloeibare vaseline. Vervolgens werden de ovaria gelokaliseerd door de probe te draaien over een hoek van 45-90° in wijzer- en tegenwijzerzin. Een via RTU waargenomen preovulatoire follikel had een diameter van gemiddeld  $6,3 \pm 1,0$  mm. Bij echografisch onderzoek waren er geen significante verschillen tussen het aantal waargenomen follikels via RTU en na het versnijden van de ovaria, althans bij follikels met een diameter groter dan 2 mm. De echografische waarneming van follikels kleiner dan 2 mm bleek veel minder betrouwbaar. Via RTU wordt een CL waargenomen als een goed omschreven structuur met een ronde of ovale conformatie. Het binnenste luteale weefsel geeft een homogeen, gegranuleerd echografisch beeld.

## MOGELIJKHEDEN VAN DE GEASSISTEERDE VOORTPLANTING

### Inductie en synchronisatie van de oestrus en ovulatie

De inductie en synchronisatie van de oestrus en ovulatie zijn zeer belangrijk bij de geit omdat het seizoenkwekers zijn en omdat artificiële voortplantingsprogramma's buiten het natuurlijke voortplantingsseizoen zonder oestrusinductie bijgevolg onmogelijk zouden zijn. Hierbij is het van groot belang een zo klein mogelijke variatie te bekomen van het interval tussen de behandeling en het optreden van oestrus en ovulatie. Bij een ideaal inductie- en synchronisatieprotocol zou men op een vooraf bepaald tijdstip moeten kunnen insemineren. Meestal gebruikt men voor oestrussynchronisatie bij geiten een progesteronbehandeling gedurende 9-11 dagen, gecombineerd met de toediening van een luteolytische dosis prostaglandinen, 48 uur vóór het beëindigen van deze progesterontherapie. De langdurige progesterontoediening kan gerealiseerd worden door middel van een intravaginale spons geïmpregneerd met een progestageen. Betere resultaten worden bekomen door gelijktijdig de prostaglandine 250-500 IU equine chorionic gonadotrophin (eCG) toe te

dienen. eCG bevordert de folliculaire groei en synchroniseert de ovulatie waardoor KI op een vooraf bepaald tijdstip kan plaatsvinden. De reactie op eCG kan nogal verschillen van dier tot dier. Veel factoren, zoals seizoen, pariteit, lichaamsgewicht en leeftijd, spelen daarbij een rol. Bij waardevolle, langer aangehouden dieren kan de reactie op eerdere behandelingen nuttige informatie opleveren omtrent de ideale dosis. Het eCG/PGF<sub>2α</sub>-protocol blijkt echter niet altijd ideaal te werken omdat er nog een grote variatie bestaat in de tijdsduur tussen de behandeling en het optreden van de oestrus en ovulatie. Deze variatie neemt bovendien significant toe bij herhaalde behandelingen bij dezelfde dieren. Dit fenomeen wordt toegeschreven aan het ontwikkelen van anti-eCG-antistoffen na herhaalde eCG-toediening. Daarom wordt geadviseerd om dit inductie/synchronisatieprotocol met de nodige omzichtigheid aan te wenden en meermaals gebruik gedurende hetzelfde jaar te vermijden. Meer aandacht zou daarbij moeten gaan naar de oestrusdetectie en het bepalen van het meest optimale tijdstip voor inseminatie. Recent nog werd een ander protocol voorgesteld dat meer rekening houdt met de specifieke karakteristieken van de cyclus van de geit, zoals het optreden van folliculaire groeigolven iedere 5-7 dagen en de duur van de luteale fase. Bij dit zogenaamde 'short priming protocol' wordt er slechts vijf dagen progesteron toegediend via een vaginale spons. Bij de aanvang van de behandeling wordt er PGF<sub>2α</sub> geïnjecteerd, terwijl 200-300 IU eCG worden toegediend bij het verwijderen van de spons. Het aanbrengen van een uitwendige bron van progesteron in combinatie met prostaglandinen veroorzaakt een regressie van de grootste follikel en bevordert de groei van een nieuwe golf (Figuur 2). Daardoor is er een "jonge", dominante follikel aanwezig op het moment van het stoppen van de progesteronbehandeling, met een diameter van ongeveer 7 mm, die ongeveer 60 uur later zal ovuleren. Wanneer geiten in het begin van de de cyclus behandeld worden, wordt luteale regressie geïnduceerd en zal de jonge grootste follikel op dat moment (3-4 mm) blijven doorgroeien en de preovulatorische grootte (~7mm) bereiken op het moment dat de progesteronbron verwijderd wordt (Figuur 2, situatie b). Een langere progesteronbehandeling wordt geassocieerd met subluteale serum/progesteronconcentraties, wat nadelig is daar het een verlengde groei en persistentie van de grootste dominante follikel veroorzaakt. Zo worden er betere bevruchtingsresultaten bekomen na de ovulatie van jonge follikels, dan met oöcyten die afkomstig zijn van persisterende oudere follikels. Onder praktijkomstandigheden blijkt het 'short priming protocol' meer flexibel, met een betere synchronisatie dan bij geiten met een klassiek fluorogestone/ace-



**Figuur 2.** 'Short priming protocol' (naar Rubianes en Menchaca, 2003). De regressie van de grootste aanwezige follikel, bij het begin van de progesterone therapie, en de groei van de nieuwe folliculaire golf worden weergegeven in traject a. Wanneer de behandeling vroeg in de cyclus start, wordt traject b gevolgd: ontwikkeling van de op dat moment grootste aanwezige follikel (na luteolyse van het CL van de vorige cyclus).

tate (FGA)/PGF<sub>2α</sub>/eCG protocol. Het gebruik van gonadotroop releasing hormoon (GnRH) 24 uur na het verwijderen van de intravaginale progesteronspons geeft goede resultaten als een precieze timing van de ovulatie nodig is, zoals bijvoorbeeld bij KI op een vooraf bepaald tijdstip. Het GnRH verkort het interval tussen het moment van het verwijderen van de spons en de LH-piek, waardoor deze beter voorspelbaar wordt in de tijd. Dit alles geldt ook voor het interval tussen de sponsverwijdering en de ovulatie zelf.

Naast deze hormonale behandelingen bestaat er ook een aantal meer "artisanale" methoden voor de oestrusinductie en synchronisatie bij de geit. Zo doet het verschijnen van een (teaser)bok in een groep geiten, die minstens 4 tot 6 weken vóór de start van het voortplantingsseizoen niet met een bok in contact zijn geweest, oestruele cycli ontstaan binnen drie tot tien dagen. De eerste en tweede oestrus kunnen echter 'stil' verlopen, zonder duidelijke oestrussymptomen. Algemeen kan gesteld worden dat hoe dichter men het natuurlijke voortplantingsseizoen nadert, hoe beter de fertiliteit wordt. Omdat geiten op een daglichtafname reageren met oestrus en ovulatie, kan men ook gebruik maken van lichtregimes om de cyclus van de geit te beïnvloeden. Als de daglichtlengte in de wintermaanden artificieel opgedreven wordt met behulp van kunstlicht, gevolgd door een plotse overgang naar een natuurlijk daglichtregime in de lente, wordt het mogelijk om van april tot juni, dus tijdens het normale anoestrusseizoen, te kweken. De oestrus kan echter korter zijn dan normaal en is vaak ook niet zo duidelijk. De plotse aanwezigheid van een bok, nadat de geiten terug aan het natuurlijke lichtregime werden blootgesteld, ver-

hoogt de kans op succes. Er moeten voldoende lampen met een gepaste lichtintensiteit gebruikt worden en de bokken moeten aan hetzelfde lichtregime worden blootgesteld. Met dit aangepast lichtregime kunnen aflammerpercentages van 50 tot 60% bereikt worden, maar percentages van 90% worden ook beschreven. Een melatoninebehandeling tenslotte, zoals beschreven bij het schaap, blijkt bij de geit enkel effectief in combinatie met een aangepast lichtregime.

### Het afnemen en bewaren van sperma

Het afnemen en bewaren van sperma bij de bok kunnen gebeuren door gebruik te maken van een kunstvagina (41°C) in aanwezigheid van een geit in oestrus of door middel van elektro-ejaculatie. Deze laatste methode geeft ejaculaten met grotere volumes en lagere spermacentraties, maar de spermamotiliteit wordt er niet door beïnvloed. Omdat seminaal plasma de vitaliteit van de spermatozoa negatief beïnvloedt, is het gebruik van elektro-ejaculatie niet de beste methode voor sperma-afname. Tijdens het voortplantingsseizoen kan men 2 tot 7 maal per week sperma afnemen. Een periode van seksuele rust tussen de afnamen bevordert de invriesbaarheid van het sperma. Eén afname bestaat gewoonlijk uit twee ejaculaten afgenomen met een tussentijd van 2 à 5 minuten. De spermakarakteristieken variëren erg naargelang het seizoen. Het volume van het ejaculaat is groot in de herfst en de winter en daalt naar een minimum in de lente en de zomer. De spermacentratie volgt een tegengetelde trend. Ook de kwaliteit van het sperma is onderhevig aan seizoensvariatie waarbij de kwaliteit veel hoger blijkt te zijn in het voortplantingsseizoen dan daarbuiten. De karakteristieken van sperma van goede kwaliteit worden weergegeven in Tabel 1.

Het sperma van een bok kan, vers gekoeld, gestockeerd worden bij een temperatuur van 4 à 5 °C, waarbij niet-gewassen sperma zijn vitaliteit en motiliteit behoudt gedurende 5 tot 8 uur. De meest gebruikte media voor het bewaren en verdunnen van sperma zijn afgeroomde melk, natriumcitraat- en trisbevattende vloeistoffen. Het bewaren van sperma veroorzaakt echter structurele, biochemische en functionele schade aan de spermatozoa.

**Tabel 1. Karakteristieken van sperma bij de bok.**

<b>Volume ejaculaat</b>	0,5 tot 1,5 ml
<b>Concentratie (spermatozoa/ml)</b>	2,5 - 5,0 .10 <sup>9</sup> /ml
<b>Goede motiliteit</b>	70 - 90%
<b>Normale morfologie</b>	75 - 95%

Dit geldt in het bijzonder bij het invriezen, waarbij een daling van de motiliteit, vitaliteit en bevruchtingscapaciteit wordt vastgesteld. Een specifiek probleem bij het bewaren van bokkensperma is het vernietigende effect van seminaal plasma op de vitaliteit van de spermatozoa in verdunners die eidooier of melk bevatten. Voor de eidooier wordt het probleem toegeschreven aan een enzyme uit de bulbo-urethrale klier, het zogenaamde 'egg yolk coagulating enzyme' (EYCE). Voor de melk ligt het probleem bij een eiwitfractie, eveneens gesecreteerd door de bulbo-urethrale klier, het zogenaamde SBUIII, dat in aanwezigheid van melk een sterke daling van de motiliteit van de spermatozoa veroorzaakt. Het verwijderen van het seminaal plasma (door het ejaculaat onmiddellijk na afname te 'wassen') heeft een positief effect op het percentage levende cellen en hun motiliteit gedurende het bewaren in eidooier of in melkbevattende spermaverdunner. Het wassen is echter ingewikkeld en tijdrovend met bovendien een zeker verlies van spermatozoa tot gevolg. De meest gebruikte spermaverdunners zijn afgeroomde koemelkglucose (0,5 M) en trisglucosecitraanzuureidooier. Als cryoprotectant blijkt enkel glycerol in aanmerking te komen. Het sperma kan zowel in pellets als in rietjes (0,25 – 0,50 ml) worden ingevroren. Rietjes worden gedurende 4 tot 5 minuten horizontaal gekoeld in stikstofdampen, 4 tot 5 centimeter boven de vloeibare stikstof. Vervolgens worden ze in de vloeibare stikstof gedompeld (-196°C). Pellets dienen eerst op droog ijs ingevroren te worden aan -79°C om nadien in de vloeibare stikstof ondergedompeld te worden. Het ontdooien van het sperma kan het best snel gebeuren bij een temperatuur van 37 °C.

### Artificiële of kunstmatige inseminatie

Artificiële of kunstmatige inseminatie (KI) is in combinatie met oestrussynchronisatie op wereldschaal de meest gebruikte techniek uit de geassisteerde voortplanting bij de geit. Het is een relatief eenvoudige techniek met een hoog rendement die zeer veel heeft bijgedragen tot de genetische vooruitgang in de selectie van geitenrassen. Oestrussynchronisatie gecombineerd met KI maakt het mogelijk het geboorteseizoen te concentreren, wat arbeidsbesparende gevolgen heeft. Op deze manier ontstaan homogene productiegroepen, waardoor het eenvoudiger wordt het rantsoen van de geiten aan te passen aan de melkgif. Door het gebruik van KI kan het genetisch materiaal van een superieure bok efficiënter binnen een populatie verspreid worden, omdat een dissociatie tussen de sperma-afname en fertilisatie in tijd en ruimte mogelijk wordt. KI is belangrijk in programma's waar de genetische waarde van een bok beoordeeld wordt via nakomelingenonder-



zoek en is onmisbaar om deze superieure bok efficiënt te kunnen inzetten. KI kan worden toegepast na een natuurlijke, gesynchroniseerde of geïnduceerde oestrus. In het eerste geval is een efficiënte oestrusdetectie zeer belangrijk. Hiervoor kunnen 'teasers' ingezet worden. Dit zijn bokken die voorzien zijn van een harnas dat de intromissie van de penis verhindert. Verder kunnen ook gevasectomiseerde bokken of een met androgenen behandelde geit worden gebruikt. Op grote, economisch uitgebate bedrijven wordt de voorkeur gegeven aan inseminatie na oestrussynchronisatie of -inductie en dit op een vooraf bepaald tijdstip. Het tijdstip van ovulatie, het spermatransport naar de eileider en de levensduur van de mannelijke en vrouwelijke gameten in acht genomen, worden geiten in natuurlijke oestrus het best geïnsemineerd in het begin van de oestrusperiode. Na oestrussynchronisatie of -inductie worden beter enkel die geiten geïnsemineerd die binnen de 30 uur na het verwijderen van de spons in oestrus zijn gekomen. Geiten die later in oestrus komen, kunnen immers een verlaagde fertiliteit vertonen. Inseminatie kan plaatsvinden 43 à 45 uur na het verwijderen van de spons. Andere studies toonden aan dat het aflammerpercentage kon worden opgetrokken van 46,3%, na één inseminatie op 50 à 55 uur, naar 66,7 %, door gebruik te maken van twee inseminaties, op 36 en 60 uur na de verwijdering van de spons. Een aanvaardbare bevruchttingscapaciteit (rond 60%) werd bekomen bij inseminatie met 60 tot 100 miljoen spermatozoa in een volume van 0,2 ml. De methode volgens dewelke het sperma bewaard wordt, bepaalt grotendeels de geprefereerde inseminatietechniek. Hoe meer sperma door het bewaren beschadigd is, hoe dieper het in de geslachtstractus moet worden afgezet om goede bevruchttingsresultaten te bekomen. Vaginale inseminatie is enkel succesvol indien vers sperma gebruikt wordt. Gekoeld en ingevroren sperma moet intracervicaal gedeponeerd worden. Om goede bevruchttingsresultaten (meer dan 70%) te bekomen met ingevroren sperma is intra-uteriene inseminatie noodzakelijk. Bij normale geiten is het mogelijk transcervicaal intra-uterien te insemineren, maar bij bepaalde geiten (bijvoorbeeld jonge geiten bij de eerste inseminatie) of bij bepaalde rassen (bijvoorbeeld dwerggeiten) lukt dit niet en dan is laparoscopische inseminatie een optie.

### **Embryotransplantatie (ET) na superovulatie**

Multiële Ovulatie en Embryo Transplantatie (MOET) zouden theoretisch gezien de artificiële reproductietechniek bij uitstek kunnen zijn voor de geit om de maternale lijn beter te benutten in de selectie. MOET is echter nooit erg populair geworden, onder andere door de hoge kosten die eraan verbonden zijn, de chirurgische vereisten

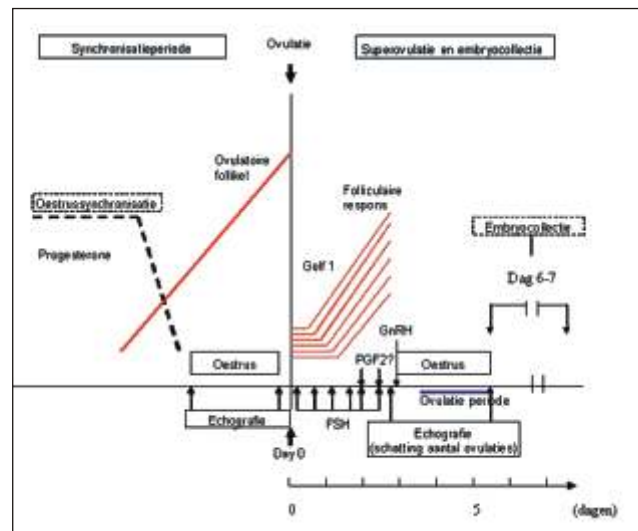
voor het verzamelen en de transplantatie van de embryo's, maar vooral door de variabele en onvoorspelbare resultaten. Deze onvoorspelbaarheid uit zich vooral in de variabiliteit van de superovulatoire respons, de slechte fertiliteit geassocieerd met een hoge ovulatoire respons en de vroege regressie van de corpora lutea. De slechte fertiliteit zou gedeeltelijk kunnen verklaard worden door een suboptimaal spermatransport in de vrouwelijke geslachtstractus na oestrussynchronisatie of door een slechte synchronisatie tussen oestrus en inseminatie. Als mogelijke oplossing voor het eerste probleem wordt laparoscopische intra-uteriene inseminatie bij de donorgeit voorgesteld, 48 uur na het verwijderen van de spons. De goede resultaten die hiermee bekomen worden, bewijzen dat de bevruchttingscapaciteit van de eicellen niet wordt aangetast door de FSH-behandeling die bij superovulatie gebruikt wordt. Als oplossing voor de gebrekkige synchronisatie tussen oestrus en inseminatie werden in de loop der jaren verschillende behandelingsprotocollen voor de donoren ontwikkeld. Aangezien geiten niet het ganse jaar door cycleren, wordt de gonadotrofinebehandeling bij superovulatie gewoonlijk voorafgegaan door een progestageentoediening via een intravaginale spons (zie hoger). Een veel gebruikt gonadotrofine is eCG dat 1 à 2 dagen vóór het wegnemen van de spons als een eenmalige intramusculaire injectie wordt toegediend aan een dosis van 1000 tot 2000 IU. Omwille van zijn relatief lange halfwaardetijd resulteert het gebruik van eCG dikwijls in een groot aantal niet-geovuleerde follikels en een corresponderende hoge oestradiolproductie. Dit probleem kan opgelost worden door een injectie van anti-eCG monoklonale antistoffen of door een injectie met GnRH op het moment dat de oestrus aanvangt. Follikel stimulerend hormoon (FSH) blijkt echter superieur aan eCG. Naast recombinant FSH (rFSH) zijn er zowel porcine als ovine hypofysaire preparaten op de markt (respectievelijk pFSH en oFSH). Een nadeel van FSH is de korte halfwaardetijd (ongeveer 5 uur), wat 6 tot 8 injecties met 12 uur interval noodzakelijk maakt. Deze FSH-behandeling start 2 à 3 dagen vóór het verwijderen van de progesteronspons. Om de nadelen van beide moleculen te neutraliseren, wordt in Australië één injectie gebruikt met een combinatie van FSH en eCG (400-800 IU). Een herhaalde behandeling met pFSH veroorzaakt echter een anti-pFSH-respons, wat herhaalde succesvolle superovulatie bij dezelfde geit bemoeilijkt. Een mogelijk alternatief is het gebruik van schapenFSH.

Deze combinaties van lange progesteronpriming met eCG of FSH houden echter geen rekening met het feit dat de cyclus van de geit onderhevig is aan folliculaire groeigolven en folliculaire dominantie (zie hoger). Omdat eerdere studies het optreden van folliculaire dominantie tij-

dens de eerste groeigolf aantoonen, is het bij geiten dus van belang met de stimulatie te starten vóór er zich een dominante follikel ontwikkelt. In dit kader werd het zogenaamde “dag 0 protocol” ontwikkeld (Figuur 3). Op dag 0 hebben alle geiten een homogene pool van groeiende, kleine follikels en is er geen dominante follikel aanwezig. De FSH-behandeling start op het moment dat de ovulatie via echografie wordt vastgesteld of op een ogenblik dat bepaald wordt door het feit dat de ovulatie normaal niet later zou optreden dan 36 uur na de aanvang van de oestrus. De totale hoeveelheid toe te dienen FSH wordt over zes gelijke dosissen verdeeld. Samen met de vijfde en zesde FSH-dosis worden twee halve dosissen PGF<sub>2α</sub> gegeven om luteolyse van het CL van de vorige ovulatie te verzekeren. Bij de aanvang van de oestrus wordt een dosis GnRH gegeven. In een succesvol MOET-programma is het mogelijk gemiddeld zes tot acht transplanteerbare embryo's per donorgeit per behandeling te verkrijgen. Dit aantal varieert echter sterk van 0 tot 30, waarbij 25% tot 50% van de donoren zelfs helemaal geen transplanteerbare embryo's opleveren. Aangezien de kosten per geboren lam na MOET tienmaal hoger liggen dan de kosten voor een lam geboren na KI spreekt het voor zich dat de toepassing van deze techniek enkel is weggelegd voor de meest waardevolle dieren. Het verzamelen van embryo's bij de donorgeit kan plaatsvinden op D6-D7, door middel van midventrale laparotomie met exteriorisatie van de uterus. Postoperatieve verklevingen kunnen echter het herhaald gebruik van een donor compromitteren. Laparoscopie daarentegen houdt een kleiner risico in op verklevingen, waardoor het wel mogelijk wordt eenzelfde donor meermaals in te schakelen. Vooraleer met het invasief inzamelen van embryo's te beginnen, is het aangewezen om via echografie te controleren in welke mate de donorgeit op de superovulatoire behandeling gereageerd heeft. Ook het inbrengen van embryo's (twee embryo's/receptor) in de gesynchroniseerde receptorgeit kan gebeuren met behulp van laparoscopie. De toestand van het uteriene milieu op het ogenblik van het ontvangen van de embryo's is kritiek voor de verdere leefbaarheid en het induceren van een dracht. De laparoscopische techniek is relatief snel en de conceptiegraad (70 à 75%) is even groot als bij het gebruik van laparotomie. Transcervicale embryotransfer werd ook reeds uitgetoetst maar de succesratio van deze techniek is nog te laag bij de geit.

### Cryopreservatie van geitenembryo's

Voor de cryopreservatie van geitenembryo's werd initieel dimethylsulfoxide (DMSO) als cryoprotectant gebruikt maar ethyleenglycol blijkt te resulteren in een ho-



**Figuur 3. Dag ‘0’ protocol (naar Rubianes en Menchaca, 2003).**

gere overlevingsgraad van embryo's die zelfs die van verse embryo's benadert. Ethyleenglycol biedt ook het voordeel dat de embryo's onmiddellijk na het ontdoeien kunnen worden ingeplant. Veelbelovende resultaten worden bekomen met de zogenaamde ‘open pulled-straw vitrification’ waarbij een overlevingspercentage van 64% voor geitenembryo's wordt gehaald. Hierbij worden de embryo's ‘gevitriciseerd’ of ‘verglasd’ in aanwezigheid van een zeer hoge dosis cryoprotectant, waardoor bij het onderdompelen in de vloeibare stikstof geen ijskristallen worden gevormd zodat de schade aan het embryo minimaal blijft. De embryo's worden in de vloeibare stikstof gebracht in een zeer dun rietje waardoor de temperatuurdaling extreem vlug gebeurt.

### In vitro productie van embryo's

*In vitro* productie van embryo's (IVP), waarbij oöcyten in de proefbuis gerijpt en bevrucht worden, kan een oplossing bieden voor sommige problemen geassocieerd met standaard MOET-technieken. Het spreekt voor zich dat deze hoogtechnologische voortplantingstechnieken slechts zijn voorbehouden voor donoren met een uitzonderlijk genetisch potentieel of voor dieren die werden gekweekt door kloning of transgenese en daardoor van groot belang kunnen zijn voor het wetenschappelijk onderzoek. Voor IVP kunnen zowel oöcyten afkomstig uit slachthuisovaria als oöcyten van levende donorgeiten gebruikt worden. De combinatie van ovum pick-up (OPU) met IVP, zoals beschreven bij het rund, biedt ook bij de geit interessante perspectieven. Zo blijken de resultaten in een voldoende gestandaardiseerd systeem meer voorspelbaar en aan minder variatie onderhevig dan bij MOET. De technieken voor *in vitro* maturatie (IVM) van folliculaire oöcyten, hun “*in vitro* fertilisatie” (IVF) met



*in vitro* gecapaciteerde spermatozoa en de *in vitro* cultuur (IVC) van de resulterende embryo's zijn succesvol gebleken zowel bij het schaap als bij de geit. Zo is het ongeveer vijftien jaar geleden dat de eerste proefbuisgeitenlammeren het levenslicht zagen. De opbrengstratio's lammeren/oöcyten van de verschillende IVP-systemen schommelen tussen 10% en 20%. Merkwaardig genoeg werden geen significante verschillen vastgesteld tussen de *in vitro* embryo-ontwikkeling van oöcyten afkomstig van prepuberale en van volwassen geiten. In combinatie met een uitzonderlijk goede respons op de gonadotrofine-stimulatie bij prepuberale geiten maakt dit de combinatie OPU/IVF zeer interessant. Het generatie-interval van genetisch waardevolle geiten kan met deze techniek drastisch worden verkort (= 'velogenesis'). Verder laat het gebruik van OPU/IVF toe nakomelingen te produceren van dieren waarbij KI en MOET geen optie (meer) zijn, zoals bij prepuberale, drachtige, puerperale, steriele of oudere geiten. Oöcyten verkregen via OPU vormen blijkbaar een goede basis voor de productie van zygoten bestemd voor de micro-injectie van DNA en de productie van transgene geiten. Dit kan interessant zijn daar de melkklier van de geit een uitstekende capaciteit bezit om proteïnen te synthetiseren. De meest gebruikte techniek voor eicelaspiratie bij de geit is de laparoscopische ovum pick-up (LOPU), die reeds bij het schaap werd beschreven in 1974. De techniek werd echter pas op punt gesteld na de ontwikkeling van IVF-technieken bij kleine herkauwers. De ooi of geit wordt voorbereid zoals voor laparoscopische inseminatie, waarna drie trocars in de buikwand worden aangebracht en de abdominale holte wordt gevuld met gefilterde lucht. Met een grijptang wordt het ovarium in de geschikte positie gebracht voor de visualisatie en punctie van de follikels. De procedure duurt gemiddeld 10 à 20 minuten per donor. Omdat met deze techniek hoge 'recovery rates' kunnen worden gehaald (tot 80 %) kan men in een sessie van 2 à 3 uur mogelijk 100 oöcyten aspireren (van meerdere donoren). Verder werd er ook een techniek van echografisch geleide, transvaginale eicelaspiratie beschreven bij de geit in ruglig onder volledige verdoving. Deze techniek is in principe minder invasief dan de laparoscopie. Hierbij werd gebruik gemaakt van een 5 MHz-humane, vaginale sectoriële transducer. De operator brengt zijn midden- en wijsvinger in het rectum en probeert de ovaria caudolateraal van het intercornuaal ligament te lokaliseren. Indien dit moeilijk lukt wordt de meest caudale cervixring gegrepen met een steriele forceps en naar caudaal getrokken waardoor de uterusbifurcatie en de ovaria binnen het bereik van de vingers van de operator komen. Net zoals bij het rund kan na de fixatie van het ovarium en de echografische lokalisatie van de follikel de punctienaald door het

naaldgeleidingssysteem naar voren worden geschoven en kan de follikel dwars doorheen de vaginawand aangeprikt worden. De 'recovery rates' van de LOPU- en de TUGA (transvaginal ultrasound-guided aspiration)-techniek blijken niet significant van elkaar te verschillen (respectievelijk 71,5% en 61%), maar het aantal aangeprikte follikels is wel hoger met de LOPU-techniek zodat het gebruik van deze techniek ook resulteert in meer eicellen.

## CONCLUSIE

Daar waar de gedomesticeerde geit in onze veeteeltsector een randfenomeen is en vooral als hobbydier wordt gehouden, is zij voor vele ontwikkelde en zich ontwikkelende landen een zeer belangrijke bron van dierlijk eiwit. De seizoengebonden voortplanting versterkt de mogelijke voordelen van het toepassen van geassisteerde voortplantingstechnieken om het voorplantingsseizoen te verlengen en/of om het genetisch potentieel van waardevolle dieren maximaal te benutten. De meest voor de hand liggende technieken zijn kunstmatige inseminatie, al of niet in combinatie met bronstinductie en -synchronisatie. Deze laatste technieken worden op commerciële bedrijven aangewend omdat ze de moeilijke bronstwaarneming vergemakkelijken en een inseminatie op een vooraf bepaald tijdstip mogelijk maken. Superovulatie en embryo-transplantatie kennen een wisselend succes omwille van de sterk variabele respons op de hormonale stimulatietherapie en de noodzaak tot chirurgische interventie bij het overplanten van de embryo's. De *in vitro* productie van embryo's uitgaande van slachthuisovaria of van eicellen die werden bekomen na laparoscopische follikelaspiratie levert voldoende reproduceerbare resultaten. Het spreekt echter voor zich dat deze techniek is weggelegd voor deze donoren van de beste genetische kwaliteit. Het korte generatie-interval maakt van de multipare geit een interessant doeldier voor het kloononderzoek. Het feit dat de geit relatief makkelijk vreemde stukjes genoom in haar erfelijk materiaal laat inplanten, in combinatie met een voldoende eiwitexpressie in de melk, maakt van de geit een interessant doeldier voor de transgenese.

## DANKBETUIGING

De auteurs danken A. Houvenaghel voor het kritisch doorlezen van het manuscript en de waardevolle suggesties.

## SELECTIEVE BIBLIOGRAFIE

- Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Keefer C., Lazaris A., Karatzas C.N. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology* 57, 275 - 284.
- Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Gauthier M., Neveu N., Lapointe J., Sneek L., Leduc M., Duguay F., Zhou J.F., Lazaris A., Karatzas C.N. (2003). Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 59, 831 - 839.
- Baldassarre H., Karatzas C.N. (2004). Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science* 82-83, 255-266.
- Baril G., Leboeuf B., Saumande J. (1993). The relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40, 621 - 628.
- Bols P.E.J., Van Soom A., de Kruijff 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.
- Cognié Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51, 105 - 116.
- Cognié Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology* 59, 171 - 188.
- de Castro T., Rubianes E., Menchaca A., Rivero A. (1999). Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentration during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology* 52, 399 - 411.
- Drion P.V., Furtoss V., Baril G., Manfredi E., Bouvier F., Pougard J-L., Bernelas D., Caugnon P., McNamara E.M., Remy B., Sulon J., Beckers J-F., Bodin L., Leboeuf B. (2001). Four years of induction/synchronisation of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reproduction Nutrition and Development* 41, 401 - 412.
- Freitas V.J.F., Baril G., Saumande J. (1997). Estrus synchronisation in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implants. *Animal Reproduction Science* 46, 237 - 244.
- Ginther O.J., Kot K. (1994). Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 42, 987 - 1001.
- Graff K.J., Meintjes M., Dyer V.W., Paul J.B., Denniston R.S., Ziomek C., Godke R.A. (1999). Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology* 51, 1099 - 1119.
- Hunter M.G., Robinson R.S., Mann G.E., Webb R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science* 82-83, 461 - 477.
- Izquierdo D., Villamediana P., Lopez-Bejar M., Paramio M.T. (2002). Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57, 1431 - 1441.
- Karatzas G., Karagiannidis A., Varsakeli S., Brikas P. (1997). Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48, 1049-1059.
- Koeman J., Keefer C.L., Baldassarre H., Downey B.R. (2003). Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 60, 879 - 889.
- Leboeuf B., Restall B., Salamon S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62, 113 - 141.
- Menchaca A., Pinczak A., Rubianes E. (2002). Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology* 58, 1713 - 1721.
- Pierson J.T., Baldassarre H., Keefer C.L., Downey B.R. (2003). Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. *Theriogenology* 60, 397 - 406.
- Rubianes E., Menchaca A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science* 78, 271 - 287.
- Snyder D.A., Dukelow R. (1974). Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnosis, and follicle aspiration in sheep. *Theriogenology* 2, 143-148.
- Simões J., Potes J., Azevedo J., Almeida J.C., Fontes P., Baril G., Mascarenhas R. (2005). Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Serrana goats. *Animal Reproduction Science* 85, 263 - 273.