

FOKKEN VAN ASSISTENTIEHONDEN MET GEASSISTEERDE VOORTPLANTINGSTECHNIEKEN

Aantal woorden: 8.231

Liza Andree

Studentennummer: 01610510

Promotor: Prof. dr. Ann van Soom

Promotor: Dr. Eline Wydooghe

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, nog dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

VOORWOORD

Middels dit voorwoord wil ik mijn dank betuigen aan mijn promotoren, professor dr. Ann van Soom en dierenarts Eline Wydooghe voor de begeleiding. Verder wil ik ook mijn ouders bedanken voor hun steun en vertrouwen in mij deze afgelopen zes jaar.

INHOUDSOPGAVE

1. Samenvatting	p. 5
2. Inleiding	p. 6
3. Bewaren van het genetisch materiaal	p. 8
3.1. Collecteren en bewaren van de oöcyten	p. 8
3.1.1. Anatomie van de ovaria	p. 8
3.1.2. Ontwikkeling van de oöcyten	p. 9
3.1.3. Methodes van collecteren	p. 10
3.1.4. Selectie van de follikels/ oöcyten	p. 11
3.1.5. Cryopreservatie van oöcyten	p. 12
3.2. Collecteren en bewaren van epididymaal sperma	p. 13
3.2.1. Anatomie van de testis en epididymis	p. 13
3.2.2. Ontwikkeling van de spermatocyten	p. 15
3.2.3. Methodes van collecteren (post orchidectomie)	p. 17
3.2.4. Kwaliteitscontrole van de spermatocyten	p. 19
3.2.5. Cryopreservatie van spermatocyten	p. 20
4. Toepassen van geassisteerde voortplanting	p. 21
4.1. <i>In vitro</i> productie (IVP)	p. 21
4.1.1. <i>In vitro</i> maturatie (IVM) van oöcyten	p. 21
4.1.2. <i>In vitro</i> fertilisatie (IVF)	p. 21
4.1.3. <i>In vitro</i> cultuur (IVC) van de bevruchte oöcyten	p. 22
4.2. Embryotransfer	p. 22
4.3. Oestrussynchronisatie	p. 22
4.4. Klonen	p. 24
5. Discussie	p. 25
6. Conclusie	p. 26
7. Referenties	p. 27

1. SAMENVATTING

Het doelbewuster fokken van assistentiehonden wordt steeds belangrijker. Assistentiehonden behoren vaak tot middelgrote rassen die relatief gemakkelijk te trainen zijn, zoals Labrador Retrievers, Golden Retrievers, Duitser Herders en kruisingen van deze rassen (Wigham et al., 2017). In de meeste gevallen worden de geselecteerde honden op jonge leeftijd gecastreerd of gesteriliseerd voordat ze effectief in training gaan. Als na enkele jaren training blijkt dat het goede assistentiehonden zijn, kan hier bijgevolg niet meer mee gefokt worden. Op die manier gaat het genetisch materiaal van goede assistentiehonden verloren. Daarom biedt het verzamelen en invriezen van onrijpe of rijpe eicellen en epididymaal sperma een mogelijke oplossing, want op dat moment kunnen de gameten alsnog gebruikt worden voor de voortplanting. Het ingevroren sperma zou gebruikt kunnen worden voor kunstmatige inseminatie. De ingevroren eicellen zouden ontdooid kunnen worden en *in vitro* gerijpt (indien nodig) en bevrucht kunnen worden, om embryo's te produceren. Deze *in vitro* geproduceerde embryo's worden dan overgeplaat in een acceptorteef en op deze manier kunnen er honden gefokt worden met de genetische achtergrond van goede assistentiehonden.

Het doel van deze literatuurstudie is om een overzicht te geven van de verschillende technieken die gebruikt kunnen worden zodat het fokken van assistentiehonden veel gericht zou kunnen verlopen. Er zal worden ingegaan enerzijds op het bewaren van genetisch materiaal (sperma, eicellen, embryo's) en anderzijds op het toepassen van geassisteerde voortplantingstechnieken zoals kunstmatige inseminatie, *in vitro* productie (IVP) van embryo's, embryotransplantatie en het klonen van honden.

De belangrijkste conclusie die uit deze literatuurstudie getrokken kan worden is dat het toepassen van geassisteerde voortplanting voor het fokken van assistentiehonden niet zo evident is en dat er nog veel onderzoek uitgevoerd moet worden om dit op grote schaal toe te passen.

Sleutelwoorden: geassisteerde voortplanting – *in vitro* fertilisatie – epididymaal sperma – embryo transfer – klonen

2. INLEIDING

Geassisteerde voortplanting heeft sinds de geboorte van de eerste humane proefbuisbaby, nu veertig jaar geleden, een enorme ontwikkeling doorgemaakt. Ook bij huisdieren wordt zeer frequent geassisteerde voortplanting toegepast. Technieken die hier deel van uitmaken zijn: kunstmatige inseminatie (KI), *in vitro* fertilisatie (IVF), embryotransfer en klonen. Bij alle huisdieren kan KI uitgevoerd worden, en bij paard en rund wordt ook embryotransplantatie en *in vitro* fertilisatie uitgevoerd. Bij hond en kat zijn embryotransplantatie en *in vitro* fertilisatie nog niet goed ontwikkeld (Van Soom et al., 2014). Aan de basis van deze technieken ligt het (direct of indirect) collecteren van de gameten: de oöcyten en de spermatocyten.

Bij een kunstmatige inseminatie wordt het sperma in het vrouwelijke genitaalstelsel gebracht, zonder dat hiervoor een natuurlijke dekking noodzakelijk is. Er kan gebruik gemaakt worden van zowel vers, gekoeld en ingevroren sperma. Door gebruik te maken van gekoeld en ingevroren sperma, kan het sperma wereldwijd geïmporteerd en geëxporteerd worden. Hierdoor is de vraag naar kunstmatige inseminatie enorm toegenomen de laatste jaren (England en Millar, 2008). Daarnaast maakt ingevroren sperma het mogelijk om vanuit paternale lijn genetisch materiaal te bewaren. Echter, vanuit maternale lijn is er nood aan een teef die geslachtsrijp en intact is, en waarvan moet blijken dat het een goede assistentiehond is. Aangezien een teef gesteriliseerd wordt voordat ze in training gaat, is kunstmatige inseminatie niet mogelijk voor behoud van het genetisch materiaal via de maternale lijn.

Voor embryotransplantatie is een geslachtsrijpe teef nodig (Van Soom et al., 2014): daar de assistentiehond een vroegtijdige sterilisatie ondergaat valt deze klassieke procedure niet toe te passen. Embryotransfer is het proces waarbij de geslachtsrijpe teef ovulatie ondergaat en geïnsemineerd of gedekt wordt. Enkele dagen na de bevruchting van de eicel, wordt de uterus gespoeld om zo alle embryo's te verzamelen. Deze embryo's worden dan in een andere teef geplaatst die een gelijke cyclus heeft met de donor teef en de dracht zal uitdragen.

Tijdens het *in vitro* productieproces van de embryo's is de eerste stap de collectie van oöcyten en spermatocyten. Voor het uitvoeren van een succesvolle *in vitro* productie (IVP) van embryo's is nodig: 1) dat de verkregen oöcyten matuur (al dan niet *in vitro* gerijpt) en van hoge kwaliteit zijn, 2) dat het verkregen sperma een goede bevruchtingscapaciteit bezit, 3) dat de culturomstandigheden optimaal zijn voor de fertilisatie en de verdere ontwikkeling van het embryo, en 4) dat de acceptorteeff klaar is om het embryo te ontvangen middels een goede oestrussynchronisatie (Nagashima et al., 2015). Oestrussynchronisatie is het proces waarbij de teef in het juiste cyclusstadium komt om het embryo te ontvangen en er een dracht zal ontstaan (Kutzler, 2007). De verschillende methodes waarop oöcyten en epididymale spermacellen gecollecteerd kunnen worden, de verschillende vormen en technieken van cryopreservatie en de verschillende producten die gebruikt kunnen worden voor oestrussynchronisatie komen uitgebreid aan bod in de masterproef.

Bijkomend is het zeer belangrijk om deze genetische informatie zo lang mogelijk te kunnen bewaren, in de vorm van oöcyten, spermatocyten en eventueel embryo's. Uit een onderzoek van Hewitt (2001) blijkt dat cryopreservatie van epididymaal sperma volgens dezelfde methodes uitgevoerd kan worden als de cryopreservatie van het normale ejaculaat, met vergelijkbare spermakwaliteit na ontdooien. Cryopreservatie van de oöcyten blijkt moeilijker te zijn dan dat van de spermatocyten door verschillende factoren: de oöcyt bestaat uit een groter volume met als gevolg een daling van de oppervlakte-volume verhouding. Hierdoor zijn de oöcyten zeer gevoelig aan afkoeling en vorming van intracellulaire ijskristallen (Hewitt et al., 2001; Saragusty and Arav, 2011).

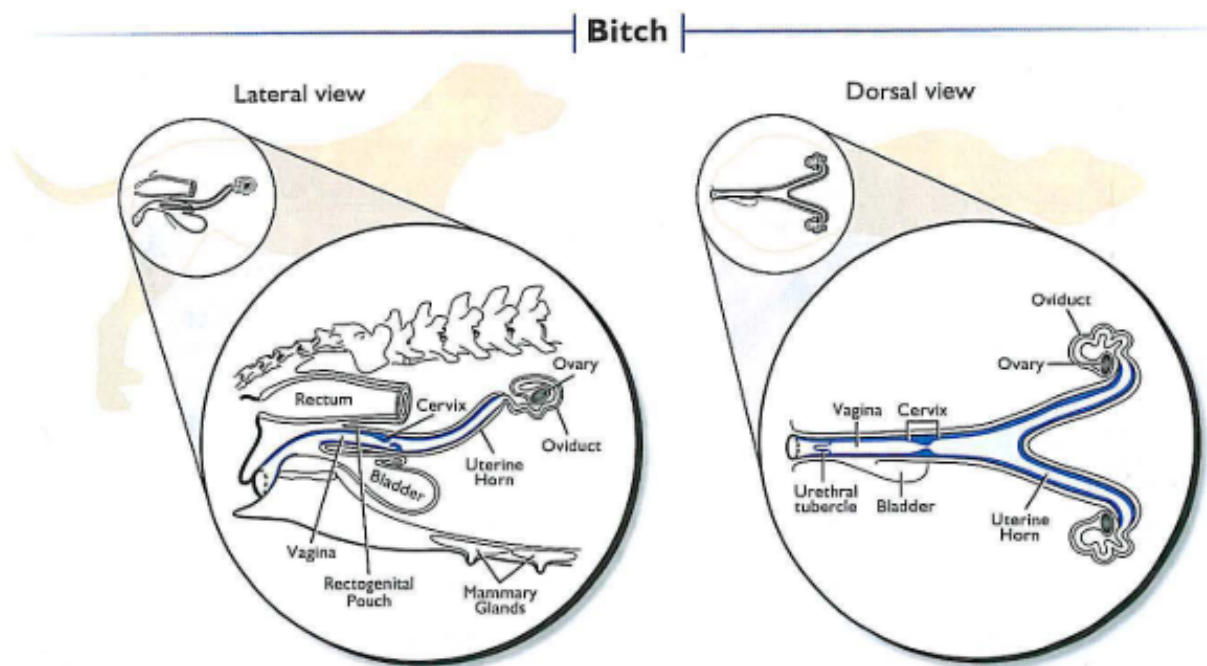
Klonen is een techniek waarbij er geen nood is aan spermacellen om een oöcyt te bevruchten. De nucleus van een mature oöcyt wordt geaspireerd, waarna de oöcyt geïnjecteerd wordt met de nucleus van een somatische cel. Fusie van de nieuwe nucleus en het cytoplasma van de oöcyt gebeurt door stroompulsen met als gevolg een activatie en celdeling. Daarna kan de embryo zich verder ontwikkelen en wordt het via de embryotransfer techniek overgebracht in een acceptorteef (Kim et al., 2010). Klonen is een techniek die al gebruikt wordt voor de productie van vee, in vergelijking met gezelschapsdieren is het aantal gekloneerde gezelschapsdieren minimaal. De belangrijkste voordelen van deze techniek zijn de productie van genetisch identiek nageslacht en de preciezere selectie van genetisch zeer waardevolle karaktereigenschappen. Een nadeel voor het gebruik van klonen is de noodzaak aan gematureerde oöcyten, het beste resultaat wordt immers bereikt met het gebruik van *in vivo* gematureerde oöcyten (Jang et al., 2010). Aangezien het nageslacht identiek DNA bevat als dat van de somatische cel (van de assistentiehond), zijn er verder geen vereisten voor de donorteef van de oöcyten (Oh et al., 2018). Het probleem van vroegtijdige sterilisatie wordt hiermee ondervangen. Desalniettemin blijft klonen een ethisch vraagstuk.

3. BEWAREN VAN HET GENETISCH MATERIAAL

3.1 Collecteren en bewaren van oöcyten

3.1.1 Anatomie van de ovaria

Het geslachtstelsel van de teef is opgebouwd uit verschillende organen: ovaria, tuba uterina, uterus, cervix, vagina en de uitwendige genitaliën (Figuur 1). De tubulaire structuren, zijnde de tuba uterina, uterus, cervix en vagina zijn opgebouwd uit vier concentrische weefsellaagen: serosa, muscularis, submucosa en mucosa (respectievelijk van buiten naar binnen). De buitenste laag, de serosa, is een enkelvoudige cellaag opgebouwd uit squameuze cellen. Daarop volgt de muscularis, een dubbele spierlaag van glad spierweefsel dat onderverdeelt kan worden in een buitenste longitudinale laag en een binnenste circulaire laag met als belangrijkste functie de mogelijkheid tot contraheren. Ter hoogte van de oviduct is dit belangrijk voor het transport van secreties, gameten en vroege embryo's richting de uterus. De muscularis van de uterus is belangrijk tijdens de partus voor de uitdrijving van de foetus en de foetale membranen. Onder de muscularis is de submucosa gelegen, deze laag varieert in dikte afhankelijk van de plaats in het geslachtstelsel. In deze laag bevinden zich de bloedvaten, zenuwen en lymfevaten. Het lumen van het geslachtstelsel wordt afgelijnd door de mucosa, afhankelijk van de plaats in het geslachtstelsel is het secretorische epitheel anders opgebouwd (Senger, 2007).



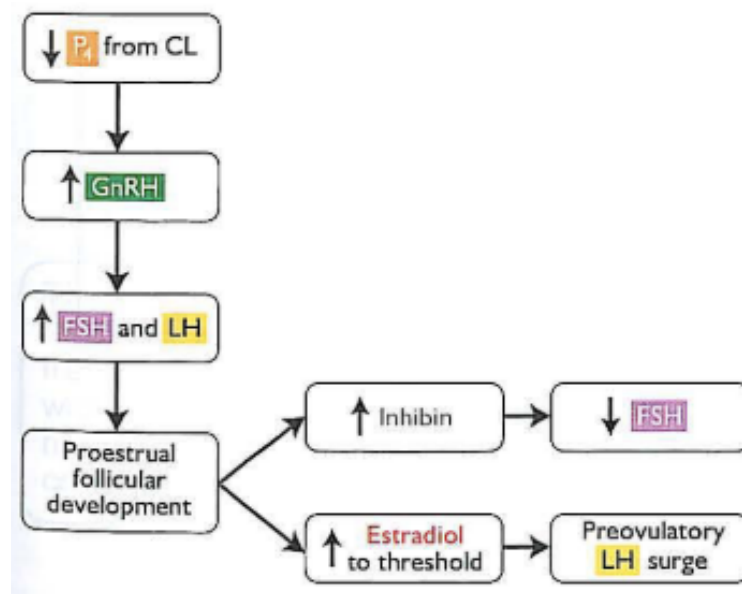
Figuur 1: Schematische voorstelling van het vrouwelijk geslachtstelsel bij de hond (Senger, 2007).

De ovaria zijn ovoide, dense structuren die instaan voor de productie van de vrouwelijke gameten, zijnde de oöcyten, en de hormonen oestrogeen en progesteron. De buitenste laag van het ovarium, de tunica albuginea, is een bindweefsellaag die bedekt wordt met een enkelvoudige laag kubische cellen ookwel het germinale epitheel genoemd. Hieronder ligt de ovariële cortex, deze bevat alle oöcyten. De cellen rondom de oöcyten helpen met de ontwikkeling en productie van de follikels tot de uiteindelijke ovulatie. Na ovulatie wordt het corpus luteum (CL) gevormd dat zich ook in de ovariële cortex bevindt. Het corpus luteum staat in voor de productie van progesteron. Het centrale deel van het ovarium wordt de ovariële medulla genoemd, hierin lopen bloedvaten, zenuwen en lymfevaten (Senger, 2007).

3.1.2 Ontwikkeling van de oöcyten

In tegenstelling tot de reu, worden teven geboren met een beperkt aantal oöcyten. De ontwikkeling van de oöcyt kan onderverdeeld worden in een intra-folliculaire en extra-folliculaire fase (Luvoni et al., 2005). Een groot deel van de ontwikkeling van de oöcyt gebeurt reeds tijdens de embryologische ontwikkeling van het dier zelf. Mitose zorgt voor vermeerdering van diploïde cellen in tegenstelling tot meiose waarbij het eindproduct een haploïde cel is (Hyttel et al., 2010).

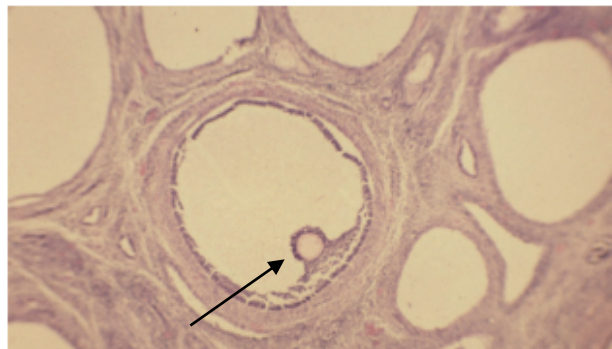
Na de puberteit wordt de folliculaire fase ingeleid door de luteolyse. De afbraak van het corpus luteum zorgt voor een afname van de concentratie progesteron in het bloed, waardoor de negatieve feedback op de vrijstelling van het *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) vanuit de hypothalamus wegvalt. Deze GnRH vrijstelling stimuleert de hypofyse om het follikelstimulerend hormoon (FSH) en het luteïniserend hormoon (LH) vrij te geven. Deze hormonen initiëren de follikelgroei en de productie en secretie van oestradiol. De folliculaire fase kan ingedeeld worden in pro-oestrus en oestrus, waarbij in de pro-oestrus periode de vrijstelling van FSH en LH episodisch gebeurt. Wanneer oestradiol een bepaald niveau in het bloed bereikt in afwezigheid van progesteron, wordt er een grote hoeveelheid GnRH vrijgesteld vanuit de hypothalamus. Dit geeft aanleiding tot de preovulatoire LH piek bij de start van de oestrus en zal aanleiding geven tot de ovulatie van meerdere follikels (Figuur 2) (Senger, 2007).



Figuur 2: schematische weergave van de hormonale veranderingen noodzakelijk voor het optreden van de preovulatoire LH piek die aanleiding zal geven tot de ovulatie (Senger, 2007).

In de ovaria worden de primordiale kiemcellen omgeven door folliculaire cellen, voornamelijk bestaande uit platte somatische cellen afkomstig van het ovariële epitheel. Deze vereniging van kiemcel en folliculaire cellen geeft aanleiding tot het oogonium. De oogonia ondergaan proliferatie en differentiatie tot een primaire oöcyt. Een groot deel van de ontwikkelende primaire oöcyten vallen af, de overgebleven starten in de profase van meiose I waarna de verdere ontwikkeling stilvalt. De primaire oöcyt in de profase van meiose I, omgeven door een laag van platte folliculaire cellen wordt de primordiale follikel genoemd. Vanaf de puberteit zullen de follikels verder ontwikkelen. Door proliferatie van de follikelcellen wordt de oöcyt omgeven door een laag van kubische cellen. Deze follikelcellen rondom de primaire follikel worden beschreven als granulosa cellen. Door de vorming van de primaire

follikel wordt ook de groei van de oöcyt gestimuleerd. Door toename van het aantal lagen granulosa cellen wordt er gesproken over de secundaire follikel. De oöcyt en de granulosa cellen produceren glycoproteïnes die de zona pellucida gaan vormen. De zona pellucida bevindt zich tussen de oöcyt en de granulosa cellen. De stromale cellen die rondom de granulosa cellen liggen differentiëren tot een theca interna en een theca externa. De theca interna cellen zijn belangrijk voor de productie van androgenen en de theca externa is opgebouwd uit losmazig bindweefsel dat de volledige follikel omgeeft. De tertiaire follikel wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een antrum. Het antrum is een met vloeistof gevulde ruimte tussen de granulosa cellen. De oöcyt verplaatst naar een uitstulping van de granulosa cellen (ookwel de cumulus cellen genoemd), de cumulus oöphorus genoemd. De cumulus oöphorus samen met de cumulus cellen wordt hierna beschreven als het cumulus oöphorus complex, of COC (Figuur 3) (Hyttel et al., 2010; Senger, 2007).



Figuur 3: histologiepreparaat van het ovarium. Centraal gesitueerd is een follikel in de pro-oestrus fase met een oöcyt (zwarte pijl). Rond de oöcyt bevindt zich een laag granulosa cellen (England, 2013).

Ovulatie in de teef is een spontaan proces, in tegenstelling tot de kattin, die een geïnduceerde ovulatie heeft. De tertiaire follikel wordt gestimuleerd door de LH piek tot ovulatie. De hormonen die een belangrijke rol spelen in dit proces zijn LH en progesteron (Hyttel et al., 2010). De wisselwerking tussen deze hormonen en de andere hormonen die een rol spelen in de oestruscyclus bij de teef worden verder besproken bij *oestrussynchronisatie*.

Bij veel zoogdieren wordt het proces van meiose hervat vlak voor de ovulatie, bij de hond gebeurt dit niet. Bij de teef worden de immature oöcyten geövuleerd die zich nog verder moeten ontwikkelen in het oviduct, voordat bevruchting mogelijk is. Bij de ovulatie bij honden komen meerdere immature eicellen vrij, gemiddeld tussen 48 en 60 uur na de LH piek. De maturatie duurt gemiddeld 48 tot 60 uur. De oöcyten kunnen dus pas bevrucht worden twee tot drie dagen na ovulatie. Na ovulatie vormen de achtergebleven cellen van de follikel zich om tot een corpus luteum. Vanuit het corpus luteum wordt progesteron geproduceerd, progesteron is noodzakelijk om een eventuele dracht in stand te houden (Senger, 2007).

3.1.3 Methodes van collecteren

Voor eventuele productie van embryo's of cryopreservatie van oöcyten is het belangrijk om de oöcyten te verzamelen. Het is de bedoeling om de cumulus oöphorus complexen (COC's) te verzamelen, een complex is opgebouwd uit een oöcyt omgeven door een zona pellucida en granulosa cellen. De leeftijd van de teef heeft een belangrijke invloed op de hoeveelheid COC's die verzameld kunnen worden. De

ovaria van de teef op een leeftijd van zes tot tien maanden oud bevat significant meer follikels dan een teef die jonger dan zes maanden of ouder dan tien maanden is. Vanaf een leeftijd van twee tot drie jaar neemt het aantal follikels enorm snel af (Songsasen & Wildt, 2007).

Er zijn twee technieken die gebruikt kunnen worden voor de verzameling van deze complexen, namelijk aspiratie van de follikels of folliculaire dissectie (Luvoni et al., 2005).

3.1.3.1 Aspiratie van follikels

Aspiratie van de follikels is een snelle en simpele techniek die toegepast kan worden na ovariëctomie, maar wordt toch niet frequent gebruikt bij de hond. De voornaamste reden is de duur van de anoestrus en dioestrus, omdat tijdens deze fases de follikels niet zichtbaar zijn in de ovariële cortex. Daarnaast is de aspiratie van de follikels niet gemakkelijk door de grootte van de ovaria en de follikels. Hierdoor wordt er eerder overgegaan op een blinde aspiratie van de follikels, waarbij geen selectie van de follikels op voorhand mogelijk is. Het laatste nadeel is dat de hoeveelheid complexen die verzameld wordt via de aspiratie techniek duidelijk lager ligt dan het aantal complexen verkregen via de folliculaire dissectie (Luvoni et al., 2005).

3.1.3.2 Folliculaire dissectie

Het opensnijden van de ovariële cortex gevolgd door folliculaire dissectie is enkel mogelijk op gecollecteerde ovaria tijdens een ovariëctomie. De ovaria worden bewaard in fysiologisch water aan een temperatuur van 37°C totdat er overgegaan kan worden op de procedure. De ovaria worden eerst ontdaan van vet en bloedvaten. Tijdens de procedure worden de ovaria in een petrischaal gehouden met TCM 199 medium (Gibco-Invitrogen Life Technologies, NY, USA) waaraan foetaal kalf serum, natrium penicilline-G en streptomycine sulfaat toegevoegd werd. Het ovariële weefsel wordt in plakken gedisseceerd om de COC's te verzamelen (Abe et al., 2008).

3.1.4 Selectie van follikels/ oöcyten

Voor het toepassen van geassisteerde voortplantingstechnieken is het van belang om de oöcyten van goede kwaliteit te selecteren uit de verkregen oöcyten. Enkele belangrijke criteria zijn morfologie, diameter en de cumulus conformatie. Kenmerkend aan oöcyten van de hond is de aanwezigheid van vettige dooier druppels rond de celkern (Haenisch-Woehl et al., 2003; Luvoni et al., 2005). Een donker en homogeen aspect van het cytoplasma is een eerste parameter waarop geselecteerd kan worden. Het stadium van ontwikkeling van de follikel is gerelateerd aan de diameter van de oöcyt. De oöcyten met een diameter groter dan 100 µm hebben een grotere kans om de meiose te voltooien. Het laatste criterium, de cumulus conformatie is belangrijk voor de verdere ontwikkeling van de oöcyt *in vitro*. Enkel oöcyten met meer dan twee lagen aan cumulus cellen moeten geselecteerd worden. De cumulus oöcyt complexen die op het moment van verzamelen slechts één laag aan cumulus cellen bevatten hebben een grote kans om binnen 48 uur *in vitro* te degenereren (Hatoya et al., 2006; Luvoni et al., 2005).

3.1.5 Cryopreservatie van oöcyten

De cryopreservatie van oöcyten is een belangrijke techniek voor het behoud van het vrouwelijk genetisch materiaal. Voor de cryopreservatie kan gebruik worden gemaakt van twee verschillende technieken, de zogenaamde 'controlled-rate freezing' techniek en vitrificatie (Saragusty en Arav, 2011).

'Controlled-rate freezing' is de eerste techniek die ontwikkeld is voor het bewaren van oöcyten en embryo's. Tijdens dit proces worden de oöcyten eerst blootgesteld aan een lage concentratie van cryoprotectant, glycerol of DMSO. Vervolgens wordt deze suspensie in rietjes over gebracht en afgekoeld tot een temperatuur van -5 tot -7°C. Na een aanpassingsfase wordt de suspensie zeer langzaam verder afgekoeld tot het een temperatuur bereikt van tussen de -30 tot -65°C. Op het moment dat de gewenste temperatuur bereikt is, worden de rietjes in de vloeibare stikstof geplaatst. Het belangrijkste punt in deze techniek is het langzaam afkoelen van de suspensie, zodat de intracellulaire matrix als laatste bevriest (Saragusty en Arav, 2011).

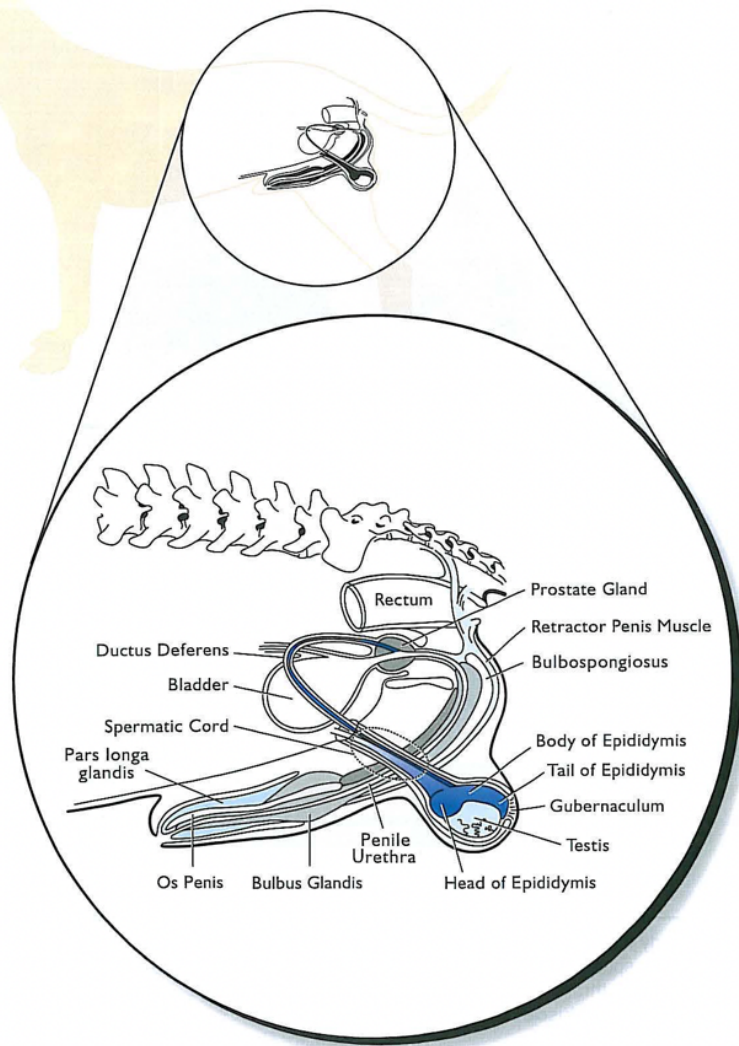
Vitrificatie is de tweede techniek en bestaat uit drie belangrijke pijlers, zijnde 1) de snelheid van afkoelen, 2) de viscositeit van het medium waarin de oöcyten of embryo's zich bevinden en 3) het volume van de in te vriezen suspensie. Voor het afkoelen wordt gebruik gemaakt van vloeibare stikstof waarin de rietjes in één keer in geplaatst worden, met als gevolg een enorm snelle afkoeling. De viscositeit van het medium is onder andere afhankelijk van de toevoegingen van het cryoprotectant. Hoe hoger de concentratie aan cryoprotectant, hoe lager de kans op kristallisatie van de kern. Het volume van de suspensie is belangrijk voor de mogelijkheid tot bevruchting. Kleinere volumes hebben een betere warmte uitwisseling, waardoor de suspensie sneller gekoeld kan worden (Saragusty en Arav, 2011).

Het probleem van cryopreservatie van de oöcyt zit voornamelijk in het volume van de cel. Een oöcyt heeft een volume dat ongeveer drie tot vier keer groter is dan een spermatozoa. Het gevolg hiervan is dat de oöcyt zeer gevoelig is aan afkoelen en zeer vatbaar is voor intracellulaire vorming van ijskristallen. Doordat de oöcyt omgeven is door een zona pellucida, kan de cryoprotectants niet gemakkelijk tot in de oöcyt komen. Met als gevolg na het ontdooien dat de zona pellucida verhard is en penetratie van de spermatozoa doorheen de zona pellucida onmogelijk is (Saragusty en Arav, 2011).

3.2 Collecteren en bewaren van epididymaal sperma

3.2.1 Anatomie testis en epididymis

Het overgrote deel van het mannelijk geslachtsapparaat bevindt zich extra-abdominaal. Het geslachtsstelsel bij de reu is opgebouwd uit de volgende onderdelen: scrotum, testikels, epididymis, ductus deferens, funiculus spermaticus, prostaat, penis en urethra (Evans en de Lahunta, 2013) (Figuur 4).



Figuur 4: Schematische weergave van het mannelijk geslachtsstelsel bij de hond (Senger, 2007).

De belangrijkste onderdelen voor de productie en opslag van de spermatozoa zijn de testikels en de epididymis. De testikels zijn ovaal van vorm en bevinden zich extra-abdominaal in het scrotum. De lengte-as van de testikel verloopt dorsocaudaal waarbij de epididymis ter hoogte van de dorsolaterale zijde is gepositioneerd (Evans en de Lahunta, 2013). De testikels staan in voor de productie van de spermatozoa, hormonen (testosteron, inhibine en oestrogenen) en proteïnen belangrijk voor de functie van de spermatozoa (Senger, 2007). Tijdens de embryonale ontwikkeling bevinden de testikels intra-

abdominaal. De testikels bevinden zich in de buurt van de externe liesring rond de tijd van de partus. Op dag 35-40 na de partus moeten de testikels de juiste positie bereikt hebben, namelijk extra-abdominaal in het scrotum (Evans en de Lahunta, 2013).

De testikels staan in voor de productie van de spermatozoa. De testikel kan opgedeeld worden in vier compartimenten: kapsel, parenchym, mediastinum en de rete tubuli (Evans en de Lahunta, 2013; Senger, 2007).

Compartiment één is het kapsel dat opgebouwd is uit drie verschillende lagen: de tunica vaginalis, de tunica albuginea en de tunica vasculosa. De tunica vaginalis is een uitzakking van het peritoneum tot in het scrotum dat bedekt wordt door de fascia spermatica en de abdominale wand. Onder de tunica vaginalis ligt de tunica albuginea, een wit fibreus kapsel, die uitloopt in het mediastinum testis. De tunica vasculosa is belangrijk voor de bloedtoevoer van en naar de testikel (Senger, 2007).

Compartiment twee is het parenchym, hierin vindt de productie van de spermatozoa plaats. Het testiculaire parenchym is verder op te delen in de tubuli seminiferi, interstitiële cellen van Leydig, bloedvaten, lymfevaten en bindweefsel. De tubuli seminiferi zijn opgebouwd uit gedraaide en rechte zaadbuisjes, waarbij de spermatogenese zich voornamelijk in de gedraaide zaadbuisjes afspeelt. De tubuli seminiferi zijn opgebouwd uit een basaalmembraan en een germinaal epitheel. Het germinale epitheel kan verder verdeeld worden in een basaal compartiment en een adluminaal compartiment. De Sertoli cellen zitten vast op het basaalmembraan en worden omgeven door een populatie van germinale cellen. Deze Sertoli cellen kunnen een beperkt aantal germinale cellen ondersteunen tijdens de ontwikkeling van de spermatozoa. Bij dieren met een groter aantal Sertoli cellen, kunnen er meer spermatozoa gelijktijdig gevormd worden. De Sertoli cellen bevatten receptoren voor FSH en testosteron. De Sertoli cellen vormen samen met de peritubulaire cellen de bloed-testis barrière. De belangrijkste functie van deze barrière is het tegenhouden van een auto-immune reactie die de ontwikkelende germinale cellen kan vernietigen. In het adluminaal compartiment bevinden zich de primaire en secundaire spermatocyten en de spermatiden. De interstitiële cellen van Leydig staan in voor de productie van testosteron (Evans en de Lahunta, 2013; Senger, 2007).

Compartiment drie is het mediastinum dat in verbinding staat met de tunica albuginea. Het mediastinum is een bindweefselstreng dat het parenchym van de testikel opdeelt in twee delen en van waaruit kleinere bindweefselsepten de testikel verder onderverdelen in lobuli. In deze lobuli lopen de tubuli seminiferi contorti waarin de spermatozoa gevormd worden. Deze tubuli seminiferi contorti komen samen in een tubuli seminiferi recti die uitloopt in de rete testis (Evans & de Lahunta, 2013; Senger, 2007)

Compartiment vier is de rete testis die in het mediastinum testis gelegen is. De rete tubuli vervoeren de spermatozoa naar de epididymis (Evans en de Lahunta, 2013; Senger, 2007).

De epididymis of bijbal is de opslagplaats van de spermatozoa. De epididymis wordt onderverdeeld in een caput, corpus en cauda epididymis. De caput epididymis begint craniomediaal van de testis en loopt naar lateraal. De corpus epididymis loopt langs de dorsolaterale zijde van de testis. De cauda epididymis zit ter hoogte van het caudale punt van de testis. Vanuit de cauda epididymis loopt de ductus deferens craniodorsaal en vormt een onderdeel van de funiculus spermaticus (zaadstreng) samen met bloedvaten en zenuwen. De temperatuur in de epididymis is lager dan de rest van het lichaam,

voornamelijk ter hoogte van de cauda epididymis. Dit komt door de positie in het scrotum en is hierdoor de beste opslagplaats voor de spermatozoa (Evans & de Lahunta, 2013).

3.2.2 Ontwikkeling van de spermatocyten

Voordat spermatozoa geproduceerd kunnen worden moet er eerste aan enkele endocriene vereisten voldaan worden:

1. Secretie van GnRH vanuit de hypothalamus
2. FSH en LH secretie vanuit de voorste kwab van de hypofyse
3. Secretie van gonadale steroïden (testosteron en oestradiol)

GnRH wordt intermitterend vrijgesteld door de hypothalamus dag en nacht. Deze korte pieken van GnRH duren slechts enkele minuten en zorgen voor een vrijstelling van LH direct gevolgd na GnRH. De vrijstelling van LH duurt 10-20 minuten. De concentratie van FSH is lager, maar de periode van vrijstelling is langer dan LH door de constante secretie van inhibine en de langere halfwaardetijd van FSH. LH werkt in op de Leydig cellen in de testis. Als LH op de receptor bindt gaan de Leydig cellen progesteron synthetiseren, dat bijna volledig wordt omgezet naar testosteron. Intermitterende vrijstelling van LH is belangrijk voor een normale functie van de testikels. Deze intermitterende vrijstelling voorkomt dat de Leydig cellen niet meer gevoelig zijn aan LH (Senger, 2007).

De functie van de Sertoli cellen is afhankelijk van FSH. Sertoli cellen kunnen testosteron omzetten in oestradiol. De exacte werking van oestradiol bij het mannelijke dier is nog niet goed gekend. Testosteron en oestradiol zorgen voor een negatieve feedback van GnRH in de hypothalamus, wat leidt tot een negatieve feedback van LH en FSH. Sertoli cellen secreteren ook inhibine, dat de FSH secretie vanuit de voorste kwab van de hypofyse inhibeert (Senger, 2007).

Spermatogenese is de proliferatie, meiose en differentiatie van de spermatocyten. Spermatogenese vindt plaats in de tubuli seminiferi en bestaat uit celdeling en morfologische veranderingen van de germinale cellen. Spermatogenese kan ingedeeld worden in drie fases:

1. Proliferatie fase: mitotische deling van de spermatogonia
2. Meiotische fase: opgedeeld in meiose I en meiose II. Tijdens meiose I vindt er DNA replicatie plaats met een productie van secundaire spermatocyten. Tijdens meiose II worden er haploïde spermatiden geproduceerd
3. Differentiatie fase: geen celdeling meer. De spermatide ondergaat een transformatie waarbij er een volledig gedifferentieerd, sterk gespecialiseerd spermatozoa ontstaat

De immature germinale cellen (spermatogonia) bevinden zich aan de buitenkant van de tubuli seminiferi dicht bij het basaalmembraan. Tijdens de proliferatie bewegen de spermatogonia richting het lumen van de tubuli seminiferi (Figuur 5). De spermatogonia zijn gespecialiseerde diploïde (2N chromosomale samenstelling) cellen die verschillende mitotische delingen ondergaan, waarbij de laatste deling resulteert in een primaire spermatocyt. Er zijn drie verschillende types van spermatogonia: A-spermatogonia, I-spermatogonia en B-spermatogonia. A-spermatogonia ondergaan verschillende

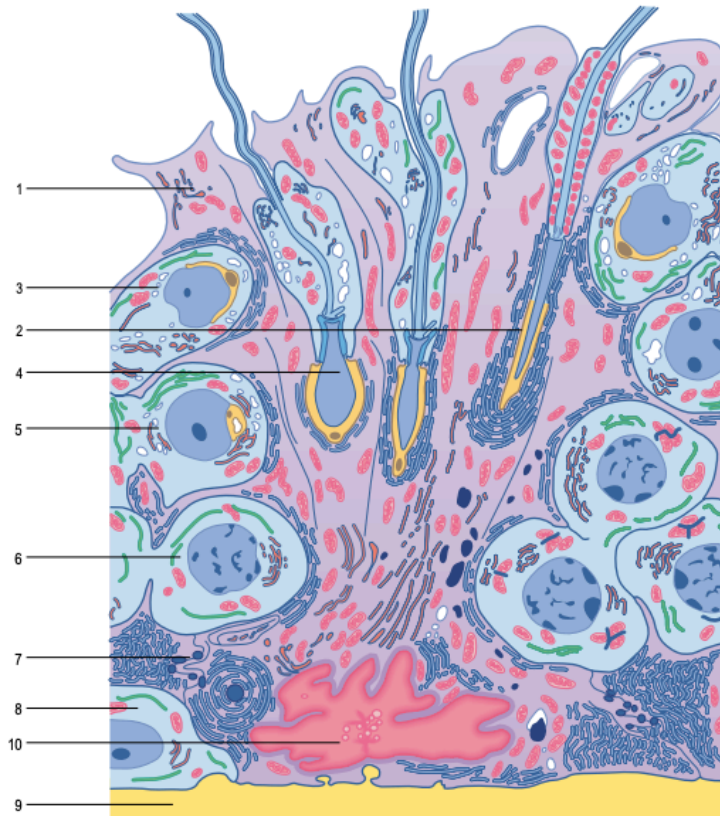
mitotische delingen van A1 tot A4. Deze A-pool van stamcellen blijft bestaan zodat dit proces altijd kan blijven plaatsvinden (Hyttel et al., 2010; Senger, 2007).

Tijdens spermatogenese wordt er van een diploïde cel naar een haploïde cel gegaan, door middel van meiose. Na de mitotische delingen van de B-spermatogonia worden er primaire spermatocyten geproduceerd. Deze primaire spermatocyten ondergaan de eerste meiotische profase. Tijdens deze profase treedt er een proces op dat 'crossing-over' wordt genoemd. Dit leidt tot een random verdeling van verschillende segmenten binnen een chromosoom. Dit leidt tot genetische heterogeniteit en zorgt ervoor dat iedere secundaire spermatocyt genetisch uniek is. De secundaire spermatocyt ondergaat de tweede meiotische deling, wat leidt tot een haploïde sferische spermatide. Deze sferische spermatiden moeten veranderingen ondergaan om vruchtbaar te worden. De nucleus wordt gecondenseerd, er vormt een acrosom en de cel wordt motiel. De mogelijkheid om zich voort te bewegen is te danken aan de ontwikkeling van een flagellum met een mitochondriale helix die voor de energie zorgt (Senger, 2007).

De differentiatie fase van de spermatozoa is opgebouwd uit vier delen:

- Golgi fase: de eerste ontwikkeling van het acrosom
- Kap fase: acrosom verspreidt zich over de nucleus
- Acrosomale fase: nucleaire en cytoplasmatische verlenging
- Maturatie fase: vorming van de spermatozoa

Het voorste twee-derde deel van de kern wordt beschermd door het acrosom. Het acrosom is een membraangebonden lysosoom die hydrolytische enzymen bevat. Deze enzymen zijn noodzakelijk voor de penetratie van de zona pellucida van de geövuleerde oocyt. De morfologie van het acrosom is verschillend per diersoort. De staart is belangrijk voor de motiliteit van de spermatocyt en zorgt voor laterale bewegingen (flagellaire beweging) (Senger, 2007).



Figuur 5: schematische voorstelling van de tubuli seminiferi. 1: Sertoli cel, 2: Spermatide in de maturatie fase, 3: Spermatide in de kap fase, 4: Spermatide in de acrosomale fase, 5: Spermatide in de Golgi fase, 6: Primaire spermatocyt, 7: Bloed-testis barrière, 8: Spermatogonium, 9: Basaal membraan, 10: Sertoli cel nucleus (Hyttel et al., 2010).

Uiteindelijk worden de finale spermatozoa vrijgelaten in het lumen van de tubuli seminiferi. Dit proces kan vergeleken worden met de ovulatie bij de vrouwelijke dieren, met de uitzondering dat dit continu gebeurt in de testikels (Senger, 2007).

Voordat de spermatozoa de oöcyt kan bevruchten is er een transitieperiode nodig in het vrouwelijke geslachtsstelsel dat capacitatie genoemd wordt. De plek waar capacitatie plaatsvindt is diersoortafhankelijk, bij de hond is dit voornamelijk in de uterus en het oviduct. Niet alle spermatozoa ondergaan capacitatie op hetzelfde tijdstip. Capacitatie is opgebouwd uit verschillende complexe processen, waarbij de belangrijkste veranderingen plaatsvinden aan het plasmamembraan (Hyttel et al., 2010).

3.2.3 Methode van collecteren (post orchidectomie)

Collecteren van sperma van de mannelijke hond kan verschillende redenen aan de basis hebben, bijvoorbeeld voor kunstmatige inseminatie, cryopreservatie of diagnostische doeleinden. Sperma afkomstig van de hond wordt routinematig ingevroren voor het behoud van de genetische informatie. De specifieke methode die gebruikt wordt voor de collectie van sperma is afhankelijk van het doeleinde (Kutzler, 2005a).

Voordat de mannelijke honden in training voor assistentiehond worden gebracht, wordt er eerst een electieve castratie uitgevoerd. Als na enkele jaren training blijkt dat het goede assistentiehonden zijn, kan hier bijgevolg niet meer mee gefokt worden. Een mogelijke oplossing hiervoor zou zijn om het sperma dat zich in de cauda epididymis bevindt op het moment van castratie te verzamelen en in te vriezen voor eventueel later gebruik. Wanneer wordt getracht epididymaal sperma in te vriezen en terug te ontdooien, moet er rekening gehouden worden met een duidelijk verschil tussen epididymaal en geëjaculeerd sperma. In de epididymis en in het vrouwelijk geslachtsstelsel vindt de morfologische en functionele maturatie plaats van de spermacellen zoals eerder beschreven (Hyttel et al., 2010).

De belangrijkste fysiologische verandering die de spermatocyt ondergaat is veranderingen in het membraan waardoor de spermatocyt bevruchtingscapaciteit verkrijgt. Inseminatie van immature spermatozoa zal niet leiden tot een fertilisatie als deze spermatozoa geen bevruchtingscapaciteit bezitten. Verder kunnen morfologische en functionele verschillen tussen de spermatozoa een invloed hebben op de membraanstabieleit en de gevoeligheid van shock en de weerkracht tegen osmotische stress. Daarnaast komt epididymaal sperma niet in contact met prostaat vloeistof. De prostaat is de enigste accessoire geslachtsklier aanwezig bij de hond. Uit een onderzoek van Hori et al. (2004) blijkt dat prostaatvloeistof een positief effect heeft op de motiliteit en bevruchtingscapaciteit na ontdooien van de epididymale spermatozoa (Hori et al., 2004).

Voor de collectie van de epididymale spermatozoa zijn twee technieken bekend: de 'float-up' methode en de retrograde flush techniek.

3.2.3.1 'Float-up' techniek

De spermastalen worden gecollecteerd door het herhaaldelijk fijnsnijden van de cauda epididymis met een scalpel, de opslagplaats van de rijpe spermatozoa, en het proximale vas deferens. Een nadeel aan deze techniek is dat de spermatozoa die gecollecteerd worden vaak gecontamineerd zijn met bloed of weefsel (Hori et al., 2015). Uit een onderzoek van Rijsselaere et al. (2004) is geconcludeerd dat de contaminatie van spermatozoa met meer dan 2% bloed een negatieve invloed heeft op de parameters na invriezen en ontdooien. Na het vriezen ontstaat er hemolyse van de erythrocyten dat aanleiding geeft tot een lagere bevruchtingscapaciteit van geëjaculeerd sperma na artificiële inseminatie. Het effect van de bloedcontaminatie zal ook een deel uitmaken van de lagere bevruchtingscapaciteit van ingevroren en ontdooid epididymaal sperma (Rijsselaere et al., 2004).

3.2.3.2 Retrograde flow techniek

Bij de retrograde flow techniek wordt het bindweefselkapsel van de epididymis verwijderd en de epididymis wordt losgehaald van de testikels. De wand van het proximale vas deferens en de cauda epididymis worden losgescheurd en met een oplossing van 0.9% natriumchloride wordt dit weefsel gespoeld zodat bloed en bindweefsel loskomt. Dit wordt tienmaal herhaald per container dat 50 ml 0.9% natriumchloride bevat, met in totaal drie containers. Aan deze container wordt een extender toegevoegd die reeds op 37°C is gebracht. Na vijf minuten in contact te zijn geweest met de spermatozoa wordt de oplossing gecentrifugeerd. Deze techniek is moeilijker toe te passen bij de hond, omdat de diameter van het vas deferens zeer klein is (Mota Filho et al., 2014).

3.2.4 Kwaliteitscontrole spermatoocyten

De ultieme test van de fertiliteit van een reu is de kans op bevruchting en de uiteindelijke grootte van de nesten. Maar dit is een proces waar veel tijd in gaat zitten. Vandaar dat er alternatieve technieken ontwikkeld zijn om de kwaliteit van de spermatoocyten te controleren. Deze kwaliteitscontrole kan gebruikt worden voor fokdoeleinden, preservatiedoeleinden, maar kan ook helpen in het diagnosticeren van ziektes bij infertiele dieren (Johnston, 1991).

De fertiliteit van de reu is een opsomming van verschillende voorwaarden:

- De mogelijkheid om sperma te produceren
- De levensvatbaarheid van de spermatozoa
- De ratio tussen morfologisch abnormale en normale spermatozoa
- Het aantal functionele spermatozoa aanwezig

De productie van de mannelijke spermatozoa gebeurt continu en in grote aantallen. Om de kwaliteit van het geproduceerde staal te beoordelen worden een aantal parameters onderzocht, onderverdeeld in een macroscopische en microscopische evaluatie. Onder de macroscopische evaluatie valt onder andere het volume, de kleur, eventuele bijmengingen en homogeniteit (Payan-Carreira et al., 2011).

Onder de microscopische evaluatie valt de beoordeling van de motiliteit, de concentratie, de morfologische abnormaliteiten en de verhouding tussen levende en dode spermatozoa. Een goed spermastaal moet ten minste 70% progressief bewegende spermatozoa bevatten, geëvalueerd met behulp van een contrastfase microscoop of via een CASA systeem (computer assisted semen analyser). Een daling van het percentage progressief bewegende spermatozoa kan wijzen op temperatuurschok, contaminatie van het staal, verlengde seksuele onthouding en systemische of infectieuze ziektes. De concentratie van de spermatozoa wordt meestal bepaald met behulp van een (Bürkerse) telkamer, spectrofotometrie of flowcytometrie (Payan-Carreira et al., 2011; Rijsselaere et al., 2005). Deze beoordeling van de morfologie gebeurt met behulp van een contrastfase microscoop of onder een gewone microscoop met gekleurde stalen. De kleuringen die hiervoor gebruikt worden zijn de gemodificeerde Giemsa kleuring (DiffQuick), Spermac[®], of een eosine-nigrosine-kleuring. Voor een correcte beoordeling moeten er minimaal 200 spermatozoa geteld worden om een percentage te kunnen berekenen. De abnormaliteiten die aangetroffen worden mogen niet meer dan 30% zijn en kunnen onderverdeeld worden in primaire en secundaire defecten. Bij primaire defecten ligt de oorsprong van het defect in de spermatogenese, in tegenstelling tot secundaire defecten die ten gevolge van abnormaliteiten in de maturatie of transport doorheen de epididymis ontstaan. De ratio tussen levende en dode spermatozoa is gebaseerd op het feit dat bij dode spermatozoa het plasmamembraan niet langer intact. De dode spermatozoa zullen bijgevolg de eosinekleuring opnemen en roze (of positief) aankleuren (Figuur 6) (Payan-Carreira et al., 2011).



Figuur 6: microscopische foto van spermatozoa gekleurd met een eosine-nigrosine-kleuring. De dode spermatozoa is roze aangekleurd, de levende spermatozoa blijven wit (Root Kustritz, 2010).

Het bepalen van het aantal functionele spermatozoa gebeurt aan de hand van de zogenaamde 'sperma functie testen'. De eerste stap is de mogelijkheid van de spermatozoa om aan de zona pellucida te binden. Het binden aan de zona pellucida is een belangrijk kenmerk van levende en actieve spermatozoa, maar betekent niet dat deze spermatozoa ook de oöcyt kunnen penetreren. Cruciaal voor de penetratie van de oöcyt is namelijk het ondergaan van de acrosoom reactie (England en Heimendahl, 2010).

3.2.5 Cryopreservatie van spermatocyten

Cryopreservatie legt het metabolisme van de spermatozoa volledig stil en verlengt zo de houdbaarheid van de spermatocyten waardoor lange bewaring en eventueel internationaal transport mogelijk is.

Na collectie van de spermatocyten via een van de bovengenoemde technieken, moet er bepaald worden hoeveel spermatocyten het staal bevat. De volgende stap is centrifugeren van het staal gedurende vijf minuten. Na het centrifugeren wordt het supernatant verwijderd en wordt aan de pellet extender (op kamertemperatuur) toegevoegd. Een extender is een vloeistofmedium dat een cryoprotectant, nutriënten, buffers en antimicrobiële eigenschappen bevat. Deze suspensie wordt in de koelkast bewaard gedurende één tot twee uur. Het cryoprotectant dat meestal gebruikt wordt om hondensperma in te vriezen is glycerol. Daarnaast wordt ook eigeel toegevoegd aan het invriesmedium, om de spermatocyten te beschermen tegen koude shock. De meest gebruikte manier om sperma in te bewaren is rietjes. Deze rietjes zijn gemaakt van PVC en kunnen 0.5 ml van de suspensie bevatten. De rietjes worden op voorhand goed geïdentificeerd met de datum, naam van de hond, ras, chipnummer en naam van het labo waar het sperma ingevroren werd. Tijdens het vullen van een rietje is het belangrijk dat er een luchtbel aanwezig blijft. Deze luchtbel voorkomt het verlies van sperma door ontstane drukverschillen na het ontdooien. Na het vullen van de rietjes worden deze ingevroren. Dit kan in een isomobox boven de damp van de vloeibare stikstof gebeuren of in een automatisch invriestoestel. De rietjes blijven in de vloeibare stikstof totdat ze ontdooid moeten worden (Hori et al. 2006, Root Kustritz, 2010).

4. TOEPASSEN VAN GEASSISTEERDE VOORTPLANTING

4.1 In vitro productie (IVP)

In vitro productie is het proces waarbij er buiten het dier embryo's ontwikkeld worden. *In vitro* productie van caniene embryo's kan opgedeeld worden in meerdere fases die hierna afzonderlijk besproken zullen worden: *in vitro* maturatie (IVM) van de oöcyten, *in vitro* fertilisatie (IVF) en *in vitro* cultuur (IVC) van de bevruchte oöcyten.

4.1.1 In vitro maturatie (IVM) van de oöcyten

Zoals eerder vermeld zijn bij honden de oöcyten op het moment van de ovulatie nog niet matuur en zullen zij normaliter in het oviduct de eerste meiotische deling verderzetten. Het milieu in het oviduct moet dus gerepliceerd worden bij een *in vitro* maturatie van caniene oöcyten (Senger, 2007). Na ovulatie hebben de oöcyten minimaal 48-72 uur de tijd nodig om zich verder te ontwikkelen om de meiose te voltooien, zowel *in vivo* als *in vitro* (Hatoya et al., 2006). Tot op heden is het nog steeds zeer moeilijk om deze omstandigheden in het laboratorium na te bootsten.

Er is reeds veel onderzoek gedaan naar het creëren van het beste medium voor de *in vitro* maturatie van oöcyten. Het toevoegen van caniene oviductcellen of somatische cellen aan het medium gaf een positief effect op de maturatie van de oöcyt. Hatoya et al., toonden in 2006 aan dat het toevoegen van embryonale muis fibroblasten (MEF) of caniene embryonale fibroblasten (CEF) aan het maturatie medium ervoor zorgt dat meer oöcyten het metafase II stadium bereiken. Het aantal oöcyten die de meiose II volledig kunnen voltooien is slechts 7.4 en 8.7% door toevoegen van respectievelijk MEF en CEF (in vergelijking met de controlegroep waarbij 6.7% van de oöcyten de meiose II voltooid) (Hatoya et al., 2006). Tot op heden blijft *in vitro* maturatie van caniene oöcyten een zeer ingewikkeld proces met teleurstellende resultaten.

4.1.2 In vitro fertilisatie (IVF)

In vitro fertilisatie is het samenbrengen van een rijpe oöcyt en spermatozoa buiten het dier. Bij *in vivo* fertilisatie is het bevruchtingspercentage zeer hoog. In contrast met *in vitro* fertilisatie waarbij dit slechts 10-50% van de oöcyten is. Intracytoplasmatische sperma injectie (ICSI) kan een oplossing zijn om het bevruchtingspercentage omhoog te brengen. Er is maar één onderzoek uitgevoerd bij honden, waarbij er slechts verdere ontwikkeling was opgetreden in 8% van de geïnjecteerde oöcyten (Chastant-Maillard et al., 2010).

In vitro fertilisatie uitvoeren bij de hond is een zeer moeizaam proces door de minimale maturatie en lage ontwikkelingskwaliteit van de *in vitro* geproduceerde oöcyten (Chastant-Maillard et al., 2010).

4.1.3 In vitro cultuur (IVC) van de bevruchte oöcyten

In vitro cultuur is de ontwikkeling van de bevruchte oöcyt totdat de zygote in een teef geplaatst kan worden. Twintig uur na inseminatie, via IVF of ICSI, wordt de 'zygote' in hetzelfde medium geplaatst als tijdens IVM. Vervanging van het medium gebeurt elke 48 uur (Hatoya et al., 2006). *In vitro* wordt er een enorm hoog aantal van oöcyten gezien die bevrucht worden door meerdere spermatozoa tegelijk (polyspermie).

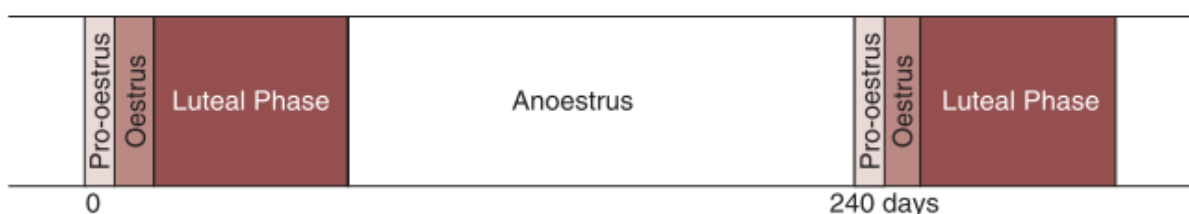
Welke techniek ook gebruikt wordt voor de toepassing van de fertilisatie om een bevruchte oöcyt te krijgen, de resultaten zijn minimaal door de moeilijke maturatie (Chastant-Maillard et al., 2010).

4.2 Embryotransfer

Embryotransfer is het proces waarbij *in vivo* of *in vitro* geproduceerde embryo's in een acceptorteef gebracht worden. Belangrijk vooraf aan implantatie is dat de acceptorteef op hetzelfde moment in de cyclus is als de ontwikkelde embryo's in het laboratorium. Hiervoor kunnen teven gebruikt worden met een spontane cyclus of indien deze niet beschikbaar zijn, kan de cyclus medicamenteus gesynchroniseerd worden. Een alternatief aan oestrussynchronisatie is het invriezen van de embryo's en de natuurlijke cyclus van de acceptorteef afwachten. In 2002 is dit éénmaal experimenteel geprobeerd door Kim et al., waarbij acht blastocysten ingevroren werden. Maar door het hoge gehalte vet in het cytoplasma van de embryo's is er nog geen succesvolle dracht ontstaan na het invriezen, ontdooien en transfereren (Kim et al., 2002). Ook de implantatie van *in vivo* geproduceerde embryo's is inefficiënt met een zeer laag succespercentage en noodzakelijkheid van chirurgie voor de collectie en transfer (Chastant-Maillard et al., 2010).

4.3 Oestrussynchronisatie

Oestrussynchronisatie is het proces waarbij de cyclus van verschillende teven op elkaar wordt afgestemd voor reproductieve belangen. De cyclus van de hond is gekenmerkt door de volgende eigenschappen: niet seizoensafhankelijk en mono-oestrus, dit wil zeggen dat een oestrus periode steeds gevolgd wordt door een periode van rust (anoestrus). De cyclus wordt in vier fases opgedeeld, de anoestrus, pro-oestrus, oestrus en metoestrus/ dioestrus (ookwel de luteale fase genoemd) (England, 2013) (Figuur 7).

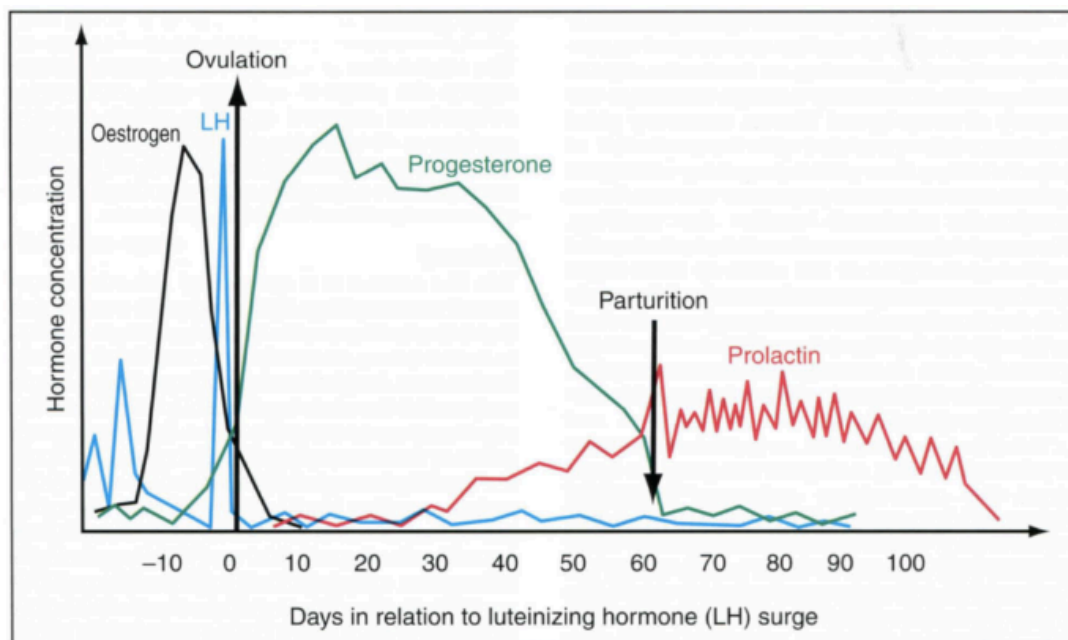


Figuur 7: schematische voorstelling van de cyclus bij de teef (England, 2013).

De pro-oestrus duurt gemiddeld negen dagen maar is zeer variabel (England, 2013). Deze periode is geassocieerd met de stimulatie van de follikels door FSH en LH waardoor er per ovarium ongeveer twee tot acht follikels zullen ontwikkelen. De granulosa cellen in de ontwikkelende follikels produceren oestrogenen wat leidt tot een verhoogde vascularisatie en oedeem van het reproductieve stelsel. Klinisch wordt deze periode herkend aan het verlies van serosanguineus vocht uit de vulva van de teef (England en Heimendahl, 2010).

De oestrusperiode, gemiddeld negen dagen, wordt gekarakteriseerd door de dekbereidheid van de teef (England, 2013). De preovulatorische LH piek treedt snel op na het bereiken van de maximale concentratie van oestrogenen in het bloed. Eén tot drie dagen volgend op de LH piek volgt een spontane ovulatie. Bij de teef vinden er meerdere ovulaties plaats, gemiddeld 48 tot 92 uur na de LH piek. De LH piek wordt vaak beschouwd als startpunt van een cyclus (England en Heimendahl, 2010). Aan het einde van de pro-oestrus treedt er reeds een subtiele luteïnisatie op van de wand van de follikels, waardoor er ook al progesteron productie is in de periode voor de ovulatie.

De luteale fase kan onderverdeeld worden in de metoestrus en dioestrus, maar dit onderscheid is klinisch niet gemakkelijk te maken. Tijdens de luteale fase blijft de progesteron concentratie in het bloed verder toenemen en is het belangrijkste hormoon voor het behoud van een eventuele dracht (Figuur 8). De progesteron concentratie is in het begin van de luteale fase gelijk bij een dracht of geen dracht, daarom kan dit hormoon niet gebruikt worden voor een eventuele bevestiging van dracht. Relaxine is het enige hormoon dat gebruikt kan worden voor bevestiging van dracht in de teef. Relaxine wordt geproduceerd door de placenta en is meetbaar in het bloed vanaf dag 25 na ovulatie (England en Heimendahl, 2010).



Figuur 8: De belangrijkste hormonale veranderingen die aanleiding geven tot ovulatie en verderzetten in een dracht en lactatie in de teef (England en Heimendahl, 2010).

Tijdens de anoestrusfase zijn de reproductieve organen in rust en deze periode duurt minimaal vier maanden (Oh et al., 2018). De beëindiging van deze fase is geassocieerd met een verhoogde vrijstelling

van LH. Tijdens de anoestrus blijft FSH aanwezig, maar zijn de concentraties van LH laag (Kutzler, 2005b). Walter et al. toonden in 2011 aan dat het inbrengen van een GnRH-antagonist, in dit geval een Deslorelin implantaat (Suprelorin®, Virbac), oestrus kon induceren en alle teven ovuleerden gemiddeld acht dagen na de eerste dag van de pro-oestrus. De fase van pro-oestrus was significant korter. Het percentage drachtige teven kende slechts een minimaal verschil in vergelijking met de controle groep (teven met een natuurlijke oestrus) (Walter et al., 2011).

4.4 Klonen

Klonen is een recente techniek waarbij embryo's *in vitro* geproduceerd worden met behulp van nucleaire transfer: de kern van een somatische cel van een donordier (de assistentiehond in dit geval) wordt gefuseerd met het cytoplasma van een mature oöcyt. Reeds in 1996 werd het eerste dier gekloond, Dolly het schaap (Oh et al., 2018). Snel volgende andere species zoals de muis, varken, konijn en kat. Het klonen van een hond verliep moeizaam door een zeer moeilijke *in vitro* maturatie van de oöcyten.

In 2005 is de eerste gekloonde hond geboren. Tijdens deze studie werden oöcyten gebruikt die *in vivo* tot metafase II in ontwikkeling zijn gekomen (ongeveer 72 uur na ovulatie) en een fibroblast van de te klonen hond. De collectie van de oöcyten vond plaats door middel van spoelen van de oviducten. De fibroblast van de te klonen hond werd verkregen door het nemen van een biopt. Het genetisch materiaal in de oöcyt werd verwijderd met behulp van micromanipulatie. Met behulp van het proces van 'somatic-cell nuclear transfer' (SCNT) werd de kern van de fibroblast gefuseerd met het cytoplasma van de oöcyt (Lee et al., 2005).

Door gebruik te maken van *in vivo* gematureerde oöcyten kunnen deze enkel om de zes tot zeven maanden gecollecteerd worden. Daarnaast zijn de hoeveelheden van oöcyten die gecollecteerd kunnen worden na ovariëctomie en IVM te laag. Daardoor blijft dit proces afhankelijk van de natuurlijke ovulatie en maturatie. Cruciaal hiervoor is het bepalen van het tijdstip van ovulatie, dit kan aan de hand van serum progesteron concentraties en vaginale cytologie (Oh et al., 2018).

Uit een onderzoek van Shin et al. (2016) blijkt dat genetisch identieke dieren een grote overeenkomst vertonen in leergedrag, geheugen en verkennend vermogen (Shin et al., 2016). Dit is een van de belangrijkste voordelen voor het gebruik van deze techniek.

5. DISCUSSIE

Het doel van deze masterproef was om een overzicht te geven van de verschillende technieken waardoor het fokken van assistentiehonden veel gericht zou kunnen verlopen. Er werd als eerste ingegaan op het behoud van de vrouwelijke gameten en de ontwikkeling te hervatten *in vitro*. De cryopreservatie van de vrouwelijke, caniene oöcyten blijkt veel lastiger te zijn dan dat van andere zoogdieren zoals het paard. De moeilijkheid zit vooral in de anatomie van het voortplantingsstelsel en fysiologie van de oöcyt. De ovaria zijn zeer klein, gemiddeld 1.5 centimeter in een hond van 11 kilogram (Evans en de Lahunta, 2013). Oöcyten zijn microscopisch klein en kunnen met het blote oog niet op het oppervlak van de ovaria gezien worden. Bijgevolg worden de oöcyten voornamelijk verzameld door middel van folliculaire dissectie door het insnijden van de ovariële cortex, na ovariëctomie (of ovariohysterectomie) van de assistentiehond in wording (Abe et al., 2008). Het voornaamste probleem zit in de noodzakelijkheid van verdere ontwikkeling van de oöcyten na ovulatie. De verzamelde oöcyten via folliculaire dissectie zijn nog immatuur en moeten *in vitro* verder ontwikkelen. Het nabootsen van de juiste omgeving is een enorm moeilijke opgave. De verdere maturatie van de oöcyten *in vitro* heeft een slagingspercentage van gemiddeld 7% (Hatoya et al., 2006). Dit is te laag om IVM op grote schaal uit te voeren.

Bij *in vitro* fertilisatie worden er oöcyten en epididymale spermatozoa samengebracht in de hoop op bevruchting. Tijdens *in vivo* fertilisatie is de bevruchttingscapaciteit zeer hoog. Door de moeizame ontwikkeling van de oöcyten *in vitro* wordt dit proces bemoeilijkt. Ook is de fertiliteit van de epididymale spermatozoa minder, waarschijnlijk omdat deze spermatozoa nog niet het volledige rijpingsproces hebben afgelegd (Simons et al., 2019). Het samenbrengen van oöcyten na IVM en epididymaal sperma, eventueel na cryopreservatie, leidt tot teleurstellende resultaten. Cryopreservatie van oöcyten en epididymaal sperma hebben negatieve effecten op de bevruchttingscapaciteit (Chastant-Maillard et al., 2010; Simons et al., 2019).

Tijdens de embryotransfer wordt het *in vitro* geproduceerde embryo in een acceptorteef geplaatst die gelijk moet lopen met haar cyclus als het embryo. De minst invasieve manier is om een acceptorteef te vinden die met haar natuurlijke cyclus gelijk oploopt als het embryo. Voor deze mogelijkheid zijn zeer veel teven nodig die zich in verschillende stadia bevinden. Als deze optie er niet is, moet er overgegaan worden om oestrussynchronisatie. Normaliter vindt er synchronisatie plaats met een andere teef, maar nu vindt er synchronisatie plaats met het embryo. Met behulp van een Deslorelin implantaat (Suprelorin®, Virbac) kan relatief gemakkelijk de cyclus aangepast worden. De kans op dracht is slechts minimaal verschillend met een teef die haar natuurlijke cyclus volgt (Walter et al., 2011).

Het klonen van dieren neemt steeds meer toe in populariteit. Het beste resultaat wordt bereikt met het gebruik van *in vivo* gematureerde oöcyten die verzameld werden door het flushen van de oviducten. Deze oöcyten kunnen verzameld worden van elke vrouwelijke hond die geslachtsrijp is en ovuleerd, want van deze oöcyten wordt enkel het cytoplasma gebruikt. De kern wordt vervangen door de kern van een somatische cel van de donorchond, in dit geval de assistentiehond. Uit een onderzoek van Shin et al. (2016), is gebleken dat een groot deel van de karaktereigenschappen erfelijk zijn en overgedragen worden op het nageslacht. Dit is een van de grootste voordelen van klonen. Aangezien het volledig

geproduceerde nageslacht opgeleid kan worden tot assistentiehond, met een groter percentage van slagen.

6. CONCLUSIE

Het toepassen van geassisteerde voortplantingstechnieken voor het fokken van assistentiehonden is een techniek die bij de hond nog in de kinderschoenen staat. Door de specifieke fysiologische en anatomische eigenschappen van voornamelijk de oöcyten blijft de *in vitro* productie van oöcyten en zygoten een uitdaging waar nog veel meer onderzoek naar gedaan moet worden.

Een andere optie is om niet te focussen op het collecteren en bewaren van de gameten, maar verder onderzoek uit te voeren naar de mogelijkheden van klonen. De honden die tot nu toe gekloond zijn vertonen geen abnormaliteiten. Een voordeel aan het klonen is dat de donorhond in kwestie gesteriliseerd of gecastreerd mag zijn aangezien er gebruik gemaakt kan worden van fibroblasten uit de huid. Daarnaast is uit verschillende onderzoeken gebleken dat selectie van de donorhond een enorm grote rol speelt in het succes van het nageslacht.

De belangrijkste conclusie die uit deze literatuurstudie getrokken kan worden is dat het toepassen van geassisteerde voortplanting voor het fokken van assistentiehonden niet zo evident is en dat er nog veel onderzoek uitgevoerd moet worden om dit op grote schaal toe te passen.

7. REFERENTIES

- Abe, Y., Dee, D., Kim, S., Suzuki, H., 2008. Vitrification of Canine Oocytes. *Journal of Mammalian Ova Research* 25, 32-36.
- Chastant-Maillard, S., Chebrou, M., Thoumire, S., Saint-Dizier, M., Chodkiewicz, M., Reynaud, K., 2010. Embryo biotechnology in the dog: a review. *Reproduction, Fertility and Development* 22, 1049-1056.
- England, G., Von Heimendahl, A., 2010. *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*, second edition. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England.
- England, G.C.W, 2013. *Dog breeding, whelping and puppy care*. John Wiley & Sons, Ltd, Chistester, United Kingdom.
- England, G.C.W, Millar, K.M., 2008. The Ethics and Role of AI with Fresh and Frozen Semen in Dogs. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 165-171.
- Evans, H.E., de Lahunta, A., 2013. *Miller's Anatomy of the Dog*, fourth edition. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA.
- Haenisch-Woehl, A., Kölle, S., Neumüller, C., Sinowatz, F., Braun, J., 2003. Morphology of canine cumulus-oocyte complexes in prepubertal bitches. *Anatomia, histologia, embryologia* 32, 373-377.
- Hatoya, S., Sugiyama Y., Torii, R., Wijewardana, V., Kumagai, D., Sugiura, K., Kida, K., Kwate, N., Tamada, H., Sawada, T., Inaba, T., 2006. Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts in IVM, IVF and IVC of canine oocytes. *Theriogenology* 66, 1083-1090.
- Hori, T., Atago, T., Kobayashi, M., Kawakami, E., 2015. Influence of different methods of collection from the canine epididymis on post-thaw caudal epididymal sperm quality. *Journal of Veterinary Medical Science* 77, 625-630.
- Hori, T., Hagiuda, K., Kawakami, E., Tsutsui, T., 2004. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology* 63, 1573-1583.
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M., 2010. *Essentials of Domestic Animal Embryology*, first edition. Saunders Elsevier, St Louis, MO, USA.
- Jang, G., Kim, M.K., Lee, B.C., 2010. Current status and applications of somatic cell nuclear transfer in dogs. *Theriogenology* 74, 1311-1320.
- Johnston, S.D., 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 21, 545-551.
- Kim, Y. J., Kim, B. J., en You, I. J. (2002). Embryo transfer with frozen embryos in the dog. *Journal of Veterinary Clinics* 19, 73-79. [In het Koreaans met Engelse abstract]
- Kim, M.J., Oh, H.J., Park, J.E., Hong, S.G., Kang, J.T., Koo, O.J., Kang, S.K., Jang, G., Lee, B.C., 2010. Influence of oocyte donor and embryo recipient conditions on cloning efficiency in dogs. *Theriogenology* 74, 473-478.
- Kutzler, M.A., 2007. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology* 68, 354-374.
- Kutzler, M.A., 2005a. Semen Collection in the dog. *Theriogenology* 64, 747-754.

- Kutzler, M.A., 2005b. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology* 64, 766-775.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Shamim, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G., Hwang, W.S., 2005. Developmental technology: Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436, 641.
- Luvoni, G.C., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D., 2005. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63, 41-59.
- Mota Filho, A.Ô.C., Silva, H.V.R., Nunes, T.G.P., de Souza, M.B., de Freitas, L.A., de Araújo, A.A., da Silva, L.D.M., 2014. Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. *Cryobiology* 69, 17-21.
- Nagashima, J.B., Sylvester, S.R., Nelson, J.L., Cheong, S.H., Mukai, C., Lambo, C., Flanders, J.A., Meyers-Wallen, V.N., Songsasen, N., Travis, A.J., 2015. Live births from domestic dog (*Canis familiaris*) embryos produced by in vitro fertilization. *PLoS ONE* 10, 1-13.
- Oh, H.J., Ra, K., Kim, M.J., Kim, G.A., Setyawan, E.M.N., Lee, S.H., Lee, B.C., 2018. The promise of dog cloning. *Reproduction, Fertility and Development* 30, 1-7.
- Payan-Carreira, R., Miranda, S., Nizanski, W., 2011. Artificial insemination in dogs. In: *Artificial insemination in Farm Animals*, first edition. InTech, Rijeka, Croatia.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., Verberckmoes, S., De Kruif, A., 2004. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 61, 1589-1602.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., De Kruif, A., 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology* 64, 706-719.
- Root Kustritz, M.V., 2010. *Clinical Canine and Feline Reproduction, evidence-based answers*, first edition. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA.
- Saragusty, J., Arav, A., 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141, 1-19.
- Senger, P.L., 2007. *Pathways to pregnancy & parturition*, third edition. Current Conceptions Inc., Redmond, OR, USA.
- Shin, C.W., Kim, G.A., Park, W.J., Park, K.Y., Jeon, J.M., Oh, H.J., Kim, M.J., Lee, B.C., 2016. Learning memory and exploratory similarities in genetically identical cloned dogs. *Journal of Veterinary Science* 17, 563-567.
- Simons, N., Van Soom, A., Domain, E., Wydooghe, E., 2019. Staalname en cryopreservatie van epididymale spermatozoa bij de hond. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 88, 77-82.
- Songsasen, N., Wildt, D.E., 2007. Oocyte biology and challenges in developing in vitro systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science* 98, 2-22.
- Van Soom, A., Rijsselaere, T., Filliers, M., 2014. Cats and dogs: Two neglected species in embryo production in vitro? *Reproduction in Domestic Animals* 49, 87-91.
- Walter, B., Otzdorff, C., Brugger, N., Braun, J., 2011. Estrus induction in beagle bitches with agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin. *Theriogenology* 75, 1125-1129.
- Wigham, E.E., Moxon, R.S., England, G.C.W., Wood, J.L.N., Morters, M.K., 2017. Seasonality and litter size in an assistance dog breeding colony in the United Kingdom. *Veterinary Record* 181, 1-6.