

4 ZUSAMMENFASSUNG

4.1 *IN VITRO* FERTILISATION BEI ZIEGEN

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Durchführung eines *in vitro* -Verfahrens zur Erstellung von Ziegenembryonen.

Nach Schlachtung der Ziegen wurden 12 Ovarien in Transportmedium (PBS + 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei einer Temperatur von 25°C) ins Labor gebracht. Die Oozyten wurden innerhalb von 4 Std. nach der Schlachtung durch Punktion makroskopisch sichtbarer Follikel (Durchmesser von 2-6 mm) gewonnen. Von 50 gewonnenen Oozyten hatten 20 der Qualität I und II (40%), 21 der Qualität III (42%) und 9 waren degenerierte Oozyten (18%). Für die *in vitro* Reifung (*in vitro* Maturation - IVM) und *in vitro* Befruchtung (*in vitro* Fertilisation - IVF) wurden 41 Oozyten der Qualität I, II und III verwendet.

Als Gewinnungs- bzw. Reifungsmedium diente TCM 199 mit Earle's Salzen, HEPES und L-Glutamin (Sigma, Deutschland) und das TCM 199 mit Earle's Salzen, Pulvermedium mit Glutamin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

Dem Reifungsmedium wurden FSH, LH und Ostradiol zugesetzt. Außerdem wurden Glukose, Natriumpyruvat Gentamycinsulfat und inaktiviertes östrisches Ziegenserum (20%) hinzugegeben.

Die IVM erfolgte bei 39°C in einer Gasatmosphäre von 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Luft für einen Zeitraum von 27 Stunden. Unmittelbar nach der Reifung wurde die IVF durchgeführt. Als Basismedium für die Kapazitierung der Spermien und die Fertilisation der gereiften Oozyten diente definiertes Medium (DM) (BRACKETT und OLIPHANT 1975), modifiziert durch Zusatz von BSA, Heparin und Gentamycinsulfat (mDM) (YOUNIS et al. 1991).

Zur *in vitro* Kapazitierung wurde frisches Mischsperma von drei Böcken 2 x in Sperm-TALP gewaschen und 2 ml des Fertilisationsmediums (mDM) unterschichtet. Nach 4 Stunden bei 39°C, 5% CO₂ in Luft, sowie 100%iger Luftfeuchte wurde von oben 1 ml abpipettiert. Zur *in vitro* Fertilisation wurden die mit expandierten Kumuluszellen umgebenen Oozyten vom Reifungsmedium in mDM umgesetzt und dann in 400 µl der Spermisuspension übertragen. Die Fertilisationsdauer betrug 20 Stunden bei 39°C unter wasserdampfgesättigter Luft mit 5% CO₂. Die

denudierten Zygoten wurden im Kulturmedium (Maturationsmedium ohne den Zusatz von den Hormonen) gewaschen und 30 Stunden mit Eileiterepithelzellen kokultiviert. Aus 41 Oozyten entwickelten sich 12 (29%) bis zum 2-4-Zell-Embryonalstadium, davon 3 bis zum 4-Zell-Stadium und 9 bis zum 2-Zell-Stadium. Die 12 Embryonen wurden chirurgisch auf zwei Empfängertiere übertragen. Einer Empfänger, der vier Embryonen sehr guter bzw. guter Qualität erhalten hatte, brachte am 5.04.1995 zwei gesunde männliche Lämmer zur Welt. Diese Ergebnis ist der zweite Fall einer Geburt gesunder Nachkommen aus einem vollständigen *in vitro* System (IVM, IVF und IVK) bei der Ziege.

4.2 TRANSZERVIKALE EMBRYONENGEWINNUNG VON NICHT NARKOTISIERTEN ZIEGEN

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer effizienten und praktischen Methode der transzervikalen Embryonengewinnung bei nicht narkotisierten Ziegen.

Es wurden insgesamt 86 transzervikale Embryonengewinnungen durchgeführt wurden. Nach Superovulationsbehandlung mittels pFSH + 40% LH oder Immunisierung gegen Inhibin wurden die Tiere während der Duldungsphase zweimal täglich gedeckt. Die Paarungsbereitschaft erstreckte sich über 1 bis 3 Tage.

Die Embryonen wurden am 5., 6. oder 7. Tag nach der letzten Bedeckung gewonnen. Als Gewinnungsmedium wurde PBS-Lösung nach Dulbecco mit Kalzium und Magnesium und einem Zusatz von 2% inaktiviertem Ziegenserum eingesetzt.

Die unblutige Embryonengewinnung wurde bei unnarkotisierten Ziegen ohne Dilatation der Zervix durchgeführt. Ein Entenschnabel-Spekulum wurde in die Vagina eingeführt. Die Portio vaginalis der Zervix wurde mittels einer Hakenzange fixiert und nach caudal gezogen. Der Spülkatheter wurde in das gewünschte Uterushorn eingeführt. Für einen Spülvorgang wurde 20 ml Spülmedium in den Uterus infundiert und nach Abkopplung des Infusionsschlauchs das zurückfließende Spülmedium aufgefangen.

In Experiment 1 erfolgte die transzervikale Embryonengewinnung sowohl am stehenden als auch am liegenden unnarkotisierten Tier. Außerdem wurden zwei verschiedene Superovulationsbehandlungen getestet.

Insgesamt wurden pro Tier 12 Uterusspülungen durchgeführt, wobei 6 Spülungen am stehenden Tier und anschließend weitere 6 Spülungen in Rückenlage durchgeführt wurden. Es wurden insgesamt 240 ml Spülmedium verwendet (je Uterusspülung 20 ml). Die Embryonengewinnungsrate lag bei 53%. Nach Auslösung der Superovulation mittels pFSH+ 40% LH wurden durchschnittlich 8.6 ± 3.6 Ovulationen pro Tier beobachtet. Bei den gegen Inhibin immunisierten Ziegen wurden durchschnittlich 5.4 ± 2.5 Gelbkörper pro Tier ermittelt. Die höhere Ovulationsrate nach der FSH + 40% LH - Behandlung ließ sich statistisch absichern. Es konnte jedoch kein signifikanter Effekt der verwendeten Superovulationsbehandlungen auf die Gewinnungsrate der Embryonen ermittelt werden (pFSH + 40% LH: 55% und Immunisierung gegen Inhibin: 50%).

In Experiment 2 wurde die Superovulation der Tiere mittels Immunisierung gegen Inhibin erreicht. Die transzervikale Embryonengewinnung erfolgte ausschließlich am stehenden Tier und die Anzahl der Uterusspülungen wurde auf insgesamt 24 erhöht. Nach den ersten 12 Spülungen wurde eine zweistündige Pause eingelegt, um dann erneut 12 Spülungen folgen zu lassen. Es wurden insgesamt 480 ml Spülmedium verwendet (je Uterusspülung 20 ml).

Bei einer Gewinnungsrate von jeweils 53% und einer Transfertauglichkeit von 46% bzw. 51% der Embryonen hatten die verschiedenen Gewinnungsverfahren keinen statistisch absicherbaren Einfluß auf Gewinnungsrate und Qualität der Embryonen.

Das Experiment 3 war eine Erweiterung von Experiment 2, wobei die Technik der transzervikalen Embryonengewinnung nicht verändert wurde. Zur Untersuchung einer $\text{PGF}_{2\alpha}$ - und Oxytocingabe auf die Embryonengewinnungsrate wurden 16, 8, oder 0 Stunden vor der Spülung 5 mg $\text{PGF}_{2\alpha}$ i.m. verabreicht. Die Verabreichung von Oxytocin (1 I.E. i.v.) erfolgte unmittelbar vor Beginn der Spülung. $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Gabe 16 und 8 Stunden vor der transzervikalen Embryonengewinnung zeigten signifikant höhere Embryonengewinnungsrate (91%, 85%, 91% und 80%) als nach $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Behandlung zu Beginn der transzervikalen Embryonengewinnung (52% und 66%). Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Behandlungen 16 und 8 Stunden vor der TEG zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied. Eine zusätzliche Oxytocingabe hatte keinen Einfluß auf die Embryonengewinnungsrate.

Zusammenfassend wird festgestellt, daß die Embryonengewinnung an der unnarkotisierten, stehenden Ziege im Anschluß an die prostaglandininduzierte Luteolyse Ergebnisse liefert, die dem chirurgischen Verfahren ebenbürtig sind.

5 SUMMARY

5.1 *IN VITRO* FERTILIZATION AND FOLLOWING *IN VITRO* CULTURE OF GOAT EMBRYOS

Since 1980 intensive investigations have been made in the field of *in vitro* fertilization (IVF) of bovine eggs. The first ruminant offspring from IVF was a bull calf born in 1981 (BRACKETT et al. 1982). Subsequently, many successful transfers of bovine embryos produced *in vitro* were reported (BRACKETT et al. 1984; SIRARD et al. 1986; BERG and BREM 1989; REICHENBACH et al. 1992; BERG 1993).

It is only since 1990 that the interest in establishing an IVF-system in goats has increased. Based on IVF in cattle, efforts to transfer this technique to IVF in goats were made. Goat offspring after transfer from IVF embryos have been reported (HANADA et al. 1985; JUFEN et al. 1991; CROZET et al. 1993 and KESKINTEPE et al. 1994). However, birth of live goat kids after transfer of embryos derived from a complete *in vitro* system (*in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture) was first reported by KESKINTEPE et al. (1994).

The aim of the present study was to establish of a practical *in vitro* technique for the production of goat embryos.

Oocytes were collected from the 12 ovaries of 6 untreated slaughtered goats. During transport to the laboratory (4h), ovaries were immersed in phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 100 IU/ml penicilin and 100 µg/ml streptomycin. The temperature was maintained at 25°C. Collection of oocytes was performed by aspiration of all superficial follicles with a diameter between 2-6 mm. Oocytes were selected under a stereo microscope (Wild M8, Heerbrugg, Switzerland) at 20 to 50x. They were washed once in maturation medium. From the 12 ovaries, 50 oocytes could be obtained (4.2 oocytes/ovaries), 20 oocytes of which were of quality I and II (40%), 21 oocytes of quality III (42%) and 9 degenerated oocytes (18%). For the the *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization, only the 41 oocytes of quality I, II and III were used.

The medium to recover the oocytes was TCM199 with Earle's salts , HEPES and L-glutamine(Sigma, Deisenhofen, Germany). The maturation medium was TCM 199 supplemented with FSH, LH, estradiol-17 β , glucose, Na-pyruvate, gentamycin sulfate and 20% heat-inactivated estrous goat serum. Culture condition for the IVM and subsequent IVF and incubation of ova were 39°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air and maximum humidity. The duration of IVM was 27 hours. Immediately after the IVM, IVF was performed. As a base medium for the capacitation of sperm and for the IFV, the defined medium (DM) (BRACKETT and OLIPHANT 1975) was supplemented with BSA, gentamycin sulfate and heparin (YOUNIS et al. 1991).

Freshly collected ejaculates from 3 breeding males of the Boer race showing normal appearance and motility were pooled. After centrifugation in Sperm-TALP, the supernatant was decanted. The sperm were resuspended in similarl medium and centrifuged again. After the second centrifugation, 300 μ l of the sperm suspension was placed in the 2 ml of the mDM. After 4 hours of the incubator (39°C, humidified air with 5% CO₂), 1 ml of the capacitation medium was aspirated from the top. The motility of the sperm was 90%. The sperm suspension was diluted to 2 x 10⁶ spermatozoa/ml with mDM. All oocytes with expanded cumulus were washed in mDM and placed in 400 μ l of the sperm suspension. The duration of the IFV was 20 hours. The denuded zygotes were washed in culture medium (maturation medium devoid of FSH, LH and estradiol-17 β) and transferred to the culture medium with a monolayer of bovine tubal epithelium cells.

From the 12 ovaries, 41 oocytes surrounded by cumulus cell were obtained. At the end of the *in vitro* culture period 12 (29%) had cleaved: nine 2-cell and three 4-cell-stage embryos. The 12 embryos were transfered to oviducts of two synchronized recipients. The first recipient received 4 good quality embryos and the second recipient received the remaining 8 embryos. The recipient that received the 4 good quality embryos remained pregnant and on April 5, 1995, gave birth to 2 healthy male kids that were raised. This result represents the second offspring in world after embryo transfer of *in vitro* matured, fertilized and cultured goat ova.

5.2 TRANSCERVICAL EMBRYO COLLECTION OF GOAT EMBRYOS WITHOUT ANESTHESIE

The aim of this present study was to develop an efficient and practical method for transcervical embryo collection in goats.

The animals used in this study were 65 Boer goats, from which 86 transcervical embryo collection have been made. The Boer goats were superovulated by pFSH + 40% LH or by immunization against the recombinant human inhibin α -subunit. When the females exhibited estrus, each was mated twice a day. The duration of the mating was usually between 1-3 days. The transcervical embryo collection was performed on day 5, 6 or 7 after mating. The transcervical uterine flushings were made with phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin supplemented with 2% heat-inactivated goat serum.

The transcervical embryo collection was performed without cervical dilatation and without anesthesia.

The donors were fixed and the cervix was located with a duck-billed speculum. The cervix was grasped using a forceps and retracted into the vagina. The flushing catheter was inserted into the selected uterine horn through the cervix. A recipient with the flushing medium was connected to the flushing catheter. When the flushing catheter was inserted into the selected uterine horn, 20 ml flushing medium was infused, then the flushing medium was recovered in 50 ml tubes.

In first experiment, the transcervical embryo collection was performed on the standing animal or the lying animal. Additionally, two different superovulation treatments were tested.

The transcervical embryo collection was performed with repeating 12 uterine flushings. The first 6 flushings were made on the standing animal and another 6 on the lying animal. It was used 240 ml flushing medium altogether (20 ml per uterine flushing). With this method 3.8 ± 3.5 embryos by 7.1 ± 3.5 ovulations (53%) were found. The superovulation treatment with pFSH + 40% LH stimulated 8.6 ± 3.6 ovulations per donor. In the superovulated animal with immunization against the recombinant human inhibin α -subunit, 5.4 ± 2.5 ovulations were observed per animal. These results were statistically different ($p < 0.01$). However, there was no significance in the effect of the superovulation treatments on the rate of the recovered embryos (pFSH + 40% LH: 55% and immunization against inhibin).

In the second experiment, the donors were superovulated only by immunization against the recombinant human inhibin α -subunit. The transcervical embryo collection was performed only on the standing animal and the number of uterine flushings was increased up to 24 altogether. There was a pause between the first 12 uterine flushings and the remaining 12 uterine flushings. 480 ml flushing medium were used (20 ml per uterine flushings).

In comparison to the rate of the recovered embryos of the embryos between the two experiments, no significant differences could be stated (rate of the recovered embryos by experiment 1: 53% and experiment 2: 53%; normal embryos by experiment 1: 46% and experiment 2: 51%).

The 3rd experiment was an extension of experiment 2. The method of the transcervical embryo collection was not altered. In this experiment the influence of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and oxytocin on the rate of recovering embryos was examined. 16, 8 or 0 hours before the transcervical uterine flushings, 5 mg of $\text{PGF}_{2\alpha}$ were given with or without oxytocin. The injection of oxytocin (1 I.U. per animal) was performed immediately before the transcervical uterine flushings. After the injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$ 16 and 8 hours before transcervical embryo collection (91%, 85%, 91% and 80%), a significant higher rate of recovered embryos could be observed ($p < 0.01$), compared to the application of $\text{PGF}_{2\alpha}$ at the beginning of the transcervical embryo collection (52% and 66%). Nevertheless, there was no significant difference in recovered embryos between the application of the $\text{PGF}_{2\alpha}$ 16 and 8 hours before the transcervical embryo collection. An additional injection of the oxytocin had no influence on the rate the recovered embryos.

To sum up, it can be stated that the transcervical embryo collection in standing goats without anaesthesia after the application of the $\text{PGF}_{2\alpha}$ yields results that are similar to the surgical collection of caprine embryos.

6 RESUMO

6.1 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* NA ESPÉCIE CAPRINA

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método viável para a produção *in vitro* de embriões da espécie caprina.

No experimento foram utilizados um total de 12 ovários, obtidos no matadouro e levados para o laboratório em um meio (PBS +100 I.E./ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) mantido a 25°C. O período entre a retirada dos ovários e a recuperação dos ovócitos no laboratório correspondeu a aproximadamente 4 horas. Os ovócitos foram aspirados de folículos de 2-6 mm de diâmetro. Um total de 50 ovócitos (4.2 ovócitos por ovário) foram recuperados. Deste total, 20 foram classificados como embriões de qualidade I e II (41%), 21 de qualidade III (42%) e 9 degenerados (18%). Apenas aqueles ovócitos de qualidade I, II e III foram utilizados na maturação e subsequente fertilização *in vitro*. Os ovócitos foram recuperados no meio TCM 199 com HEPES e L-glutamina e maturados *in vitro* no meio TCM199 suplementado com FSH, LH, estradiol e 20% de soro de cabra no estro. A maturação *in vitro* foi realizada em uma estufa, na presença de 5% de CO₂, a uma temperatura de 39°C durante 27 horas. Imediatamente após o período de maturação *in vitro* foi realizada a fertilização *in vitro*. O meio utilizado para a capacitação dos espermatozoides e subsequente para a fertilização *in vitro* foi um meio definido (DM) (BRACKETT e OLIPHANT 1975) modificado através da suplementação de BSA, heparina e gentamicina (mDM) (YOUNIS et al. 1991). Ejaculados de três bodes da raça Boer foram adquiridos com o auxílio de uma vagina artificial e misturados em um tubo de ensaio. Após a avaliação espermática (vigor e motilidade), a mistura espermática foi centrifugada por duas vezes no meio Sperm-TALP (PARRISH et al. 1986). Após as centrifugações, 300 µl da mistura espermática foram colocados sob 2 ml do mDM e incubados durante 4 horas em uma estufa na presença de 5% de CO₂, a uma temperatura de 39°C. No final deste período foi retirado 1 ml da porção superior do meio mDM. Os ovócitos que apresentaram expansão das células do cúmulus foram utilizados na fertilização *in vitro*. Estes ovócitos foram inicialmente lavados no meio mDM e em seguida

transferidos para 400 µl da suspensão espermática. A fertilização *in vitro* durou 20 horas e foi realizada nas mesmas condições de cultivo descritas para a maturação *in vitro*. Após o período de fertilização as células do cúmulus foram retiradas dos possíveis zigotos. Em seguida estes zigotos foram lavados no meio de cultura (meio de maturação sem a suplementação dos hormônios) e cocultivados com células do oviduto de bovino por 30 horas. Dos 41 ovócitos fertilizados *in vitro* 12 (29%) alcançaram os estágios de 2-4 células (3 embriões de 4 células e 9 embriões de 2 células). Os embriões foram transferidos para duas receptoras. A primeira receptora recebeu 4 embriões de qualidade I e II (3 embriões de 4 células e um embrião de 2 células). A segunda receptora recebeu oito embriões de 2 células de qualidade III. Os embriões foram cirurgicamente transferidos para o oviduto das receptoras. A receptora que recebeu 4 embriões pariu no dia 05.04.1995 dois cabritos saudáveis. Este resultado representa o segundo registro no mundo do nascimento de caprinos oriundos da transferência de embriões produzidos através da maturação, fertilização e cocultivo *in vitro*.

6.2 COLHEITA DE EMBRIÕES POR VIA TRANSCERVICAL NA ESPÉCIE CAPRINA

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma técnica mais prática e eficiente de colheita embrionária por via transcervical na espécie caprina, sem a utilização de anestesia.

Em todo o trabalho foram realizadas 86 recuperações embrionárias. Após os tratamentos superovulatórios (através da administração de pFSH + 40% LH ou através da imunização contra inibina), as doadoras foram cobertas duas vezes ao dia até não mais aceitarem a monta. A duração do estro correspondeu a 1-3 dias. Os embriões foram recuperados no 5º, 6º ou no 7º dia após o final do estro. O meio de recuperação embrionária foi PBS (*phosphate buffered saline*) suplementado com 2% de soro inativado de cabra. Este soro foi mantido durante 25 minutos a 56°C para sere inativado. A colheita embrionária por via transcervical foi conduzida com os animais em estação, sem dilatação da cervix. As doadoras foram contidas e com o auxílio de um espéculo bico de pato a cervix foi localizada. Em seguida, com o auxílio de uma pinça, a porção vaginal da cervix foi fixada e tracionada no sentido

caudal até as proximidades do vestíbulo vaginal. Posteriormente, o cateter foi introduzido através da cervix até o corno uterino desejado. Cada lavagem uterina foi realizada através da administração por gravidade de 20 ml do meio, sendo em seguida por um refluxo espontâneo procedida a recuperação do mesmo.

No experimento 1 foi conduzida a recuperação embrionária por via transcervical tanto com os animais em decúbito dorsal como também em estação, porém sem anestesia. Em cada doadora foram realizadas um total de 12 lavagens uterinas, sendo as seis primeiras conduzidas com os animais contidos em estação e as restantes com os animais em decúbito dorsal. Foram utilizados 240 ml do meio de lavagem. Neste experimento foi avaliado também o efeito de dois tratamentos superovulatórios. Através desta técnica de colheita embrionária foi alcançada uma taxa de 53% (222 corpos lúteos/118 embriões) de recuperação embrionária. O tratamento superovulatório através da aplicação de pFSH + 40% LH estimulou uma ovulação média de 8.6 ± 3.6 corpos lúteos por animal. Os animais imunizados contra inibina apresentaram uma ovulação média de 5.4 ± 2.5 corpos lúteos. Através da análise estatística foi observado que estes resultados diferem significativamente entre si. Porém, esta diferença não alterou significativamente no que concerne à taxa de recuperação embrionária (pFSH + 40% LH: 55% e imunização contra inibina 50%).

No experimento 2 estimulou-se a superovulação das doadoras apenas através da imunização dos animais contra inibina. A colheita embrionária foi realizada através de 24 lavagens uterinas com os animais contidos em estação. Inicialmente foram conduzidas 12 lavagens uterinas e após um repouso de 2 horas foram conduzidas as demais. Foram utilizadas um total de 480 ml do meio de lavagem (20 ml por lavagem uterina). Através desta técnica obteve-se uma taxa de 53% de recuperação embrionária.

Ambas as técnicas testadas (experimento 1 e 2) apresentaram a mesma taxa de recuperação embrionária (53%). Além disso foi também observado que as técnicas não interferiram na qualidade dos embriões recuperados (embriões de qualidade I e II - experimento 1: 46% e experimento 2: 51%)

A técnica para recuperação embrionária utilizada no experimento 3 foi a mesma utilizada no experimento 2. Porém, no experimento 3 foi avaliada a influência da aplicação de PGF₂ α e oxitocina sobre a taxa de recuperação embrionária. Foram conduzidos 6 grupos experimentais. As doadoras receberam dose única de 5 mg de

PGF₂α 16 horas ou 8 horas antes da recuperação embrionária ou no momento desta. Este tratamento foi acompanhado ou não pela administração de 1 U.I de oxitocina intravenosa, aplicada no momento da recuperação embrionária. As aplicações feitas 16 ou 8 horas antes da recuperação embrionária estimularam significativamente o aumento da taxa de recuperação embrionária (91%, 85%, 91% e 80%), em comparação com a aplicação de PGF₂α no momento da colheita embrionária (52% e 66%). Os resultados alcançados através das aplicações de PGF₂α 16 horas ou 8 horas não diferiram significativamente. A administração de oxitocina não alterou os resultados da recuperação embrionária.

Foi observado neste trabalho que a aplicação da PGF₂α 16 ou 8 horas antes da colheita de embriões por via transcervical, com as cabras em estação, estimulou um percentual de recuperação de embriões comparável com aquele obtido através da técnica cirúrgica. Estes resultados são apropriados para que se recomende a utilização da PGF₂α nos trabalhos de colheita de embriões pelo método não cirúrgico nesta espécie.