

ASPIRAZIONE TRANSVAGINALE DI OOCITI E FECONDAZIONE IN VITRO NEI BOVINI

Godke R. A., Bondioli K. R.

*Embryo Biotechnology Laboratory, Department of Animal Sciences LSU Agricultural Center,
Louisiana State University
Baton Rouge, Louisiana 70803 USA*

RIASSUNTO - La IVF ha le potenzialità per produrre un numero maggiore di embrioni in tempi più brevi; le procedure di aspirazione transvaginale sotto guida ecografica possono essere ripetute sulle stesse vacche tre, quattro o anche più volte al mese. L'utilizzo di TUGA e IVF costituisce un'alternativa per gli allevatori che dispongono di femmine di alto valore genetico ma che non sono in grado di produrre embrioni vitali tramite le procedure standard di raccolta degli embrioni. La tecnologia dei gameti può essere utilizzata su oociti prelevati da capi più anziani aciclici o che non ovulino, femmine con lesioni fisiche (ad esempio una zampa rotta) e vacche affette da altre patologie, come ad esempio anomalie della cervice. Sono stati ottenuti risultati positivi utilizzando le tecniche di IVF sugli oociti ottenuti da follicoli ulteriori di vacche con ovaio cistico.

Attualmente la TUGA viene utilizzata per il prelievo di oociti da femmine domestiche che rappresentano linee di sangue rare e da vacche con senescenza riproduttiva. Proseguono le ricerche per identificare applicazioni possibili per questa tecnologia, tra cui il prelievo di oociti da giovenche in età prepubere per la produzione di embrioni *in vitro*. Gli oociti vengono prelevati da capi da latte e da carne nel primo periodo postparto (<15 giorni), ben prima che le femmine riprendano il proprio ciclo riproduttivo. Questa metodica permette di produrre uno o più vitelli extra prima della monta per la gravidanza naturale. Inoltre spesso viene prelevato un numero maggiore di oociti da vacche nelle prime fasi della gravidanza piuttosto che da femmine con ciclo naturale. Questa metodica dovrebbe permettere alla femmina gravida di produrre la propria progenie naturale ogni anno e di produrre nel contempo progenie extra tramite IVF, colture embrionali e procedure di trasferimento nel recettore.

INTRODUZIONE

Nuove tecniche di riproduzione assistita continuano ad essere sviluppate per l'industria del bestiame. Alcune di queste sono di natura più meccanica che biologica. Ad esempio, l'ecografia è stata inizialmente sviluppata nell'industria del bestiame con l'obiettivo di valutare la massa muscolare dei capi vivi. Con alcune modifiche, soprattutto nella struttura della sonda e nel software, la tecnica ecografica si è trasformata in un importante strumento dagli usi molteplici a vantaggio dei produttori di bestiame. Oggi gli ecografi vengono utilizzati per valutare l'ovaio e lo sviluppo follicolare prima e dopo l'inseminazione artificiale con l'obiettivo di determinare l'ovulazione da parte della femmina. L'ecografia viene inoltre utilizzata nei test di gravidanza, per il rilevamento del battito cardiaco fetale (dopo 21 giorni di gestazione) e per la determinazione del sesso del feto durante il primo trimestre di gravidanza. Più di recente l'ecografia è stata utilizzata per lo sviluppo di un metodo di prelievo degli oociti da vacche donatrici.

Il trasferimento embrionale (TE) è stata una delle prime tecnologie resasi disponibile dopo l'inseminazione artificiale per migliorare il potenziale riproduttivo della femmina. Con il TE vengono utilizzati ormoni per ottenere la superovulazione della femmina, di modo che l'ovaio produca più di un oocita prima del momento della fecondazione. Dalla metà degli anni '70 viene utilizzata la tecnologia non chirurgica di trasferimento embrionale per aumentare la possibile progenie di femmine selezionate. Tuttavia questo approccio presenta ancora alcune difficoltà. Ad

esempio, alcune femmine non rispondono o smettono di rispondere alle sostanze stimolatorie, oppure sviluppano condizioni fisiologiche che rendono difficoltoso il recupero degli embrioni. Una delle principali preoccupazioni relative alla procedura di TE sta nel fatto che le vacche vengono mantenute non gravide in modo da poter essere sottoposte a stimolazioni ormonali per la successiva raccolta di embrioni. In caso di superovulazione e di raccolta degli embrioni possono essere necessari 60 o più giorni prima di ottenere una gravidanza tramite inseminazione artificiale o monta naturale (Bak *et al.*, 1989). Una piccola percentuale di donatrici trattate con ormoni può anche sviluppare ovaio policistico.

Fecondazione embrionale

L'avvento delle tecniche di fecondazione in vitro (IVF) ha contribuito a modificare la gestione della riproduzione animale. Questa tecnica è stata utilizzata per la prima volta per produrre progenie nel coniglio (Chang, 1959). Il primo animale d'allevamento prodotto tramite la IVF è stato un torello sano ottenuto da Brackett *et al.* (1982). Sebbene questo settore sia stato oggetto di anni di ricerca, oggi le tecniche di IVF sono ancora studiate e vengono migliorate anche per gli animali d'allevamento.

Inizialmente la produzione embrionale *in vitro* (IVP) utilizzava oociti prelevati dall'ovaio presso i mattatoi. Questa possibilità si è rilevata adeguata durante le prime sperimentazioni, quando era necessario un gran numero di oociti immaturi per sviluppare le procedure di laboratorio *in vitro*. Negli anni '80 si propose di utilizzare la IVP su animali esotici rari e, a un livello più comune, in bovini da riproduzione di grande valore genetico. Sebbene la produzione di embrioni per la IVF in laboratorio suscitasse un forte interesse tra gli operatori del settore dell'allevamento, il fatto di non conoscere l'origine genetica degli oociti utilizzati nella produzione di embrioni rese questa tecnologia inaccettabile per i produttori di bestiame.

Aspirazione transvaginale di oociti sotto guida ecografica

I primi tentativi di prelievo degli oociti da bestiame potenziale donatore vennero effettuati sia tramite procedure chirurgiche, sia tramite procedure laparoscopiche meno invasive, ma sussisteva comunque un limite al numero di procedure che potevano essere svolte in condizioni di sicurezza senza causare lesioni al donatore. In questa fase non esisteva in pratica nessun metodo sicuro e ripetibile per il prelievo degli oociti da animali d'allevamento vivi. Successivamente verso la fine degli anni '80 fu sviluppata in medicina umana una metodica per il recupero degli oociti tramite il ricorso all'ecografia che permetteva di visualizzare l'ovaio mentre un ago veniva inserito per via transvaginale nel follicolo sotto guida ecografica. In questo modo era possibile procedere all'aspirazione dell'oocita dal follicolo sottoponendolo ad una maturazione *in vitro*, alla fecondazione *in vitro* e quindi alle procedure di coltura *in vitro*.

Questi tentativi spianarono la strada alle nuove tecnologie riproduttive attualmente disponibili per gli animali d'allevamento. L'utilizzo dell'ecografia permette la visualizzazione delle strutture dell'ovaio su monitor appositi. I follicoli vengono identificati come forme circolari nere (ipoecoiche). Attualmente l'aspirazione transvaginale degli oociti sotto guida ecografica (TUGA), nota anche come OPU (ovum pick-up – prelievo di oociti) in medicina umana, viene utilizzata in vacche, capre, cavalle e più di recente in scrofe e specie esotiche ungulate.

Capi con ciclo naturale

Nel caso del bovino, la femmina donatrice viene contenuta in un apposita struttura. Viene quindi effettuato un blocco epidurale. Una sonda ecografica a settori convessa da 5-megahertz (MHz) viene posizionata sull'estremità distale di un apposito manipolo in plastica da 500 mm per la visualizzazione dell'ovaio sullo schermo di un monitor ecografico. Il manipolo in plastica (con

rivestimento in lattice protettivo) viene inserito nel canale vaginale. A questo punto l'ovaio viene afferrato per via rettale e posizionato contro il trasduttore.

Un ago da 18-G della lunghezza di 55 o 60 centimetri viene inserito attraverso il mandrino nel manipolo di plastica. L'ago viene collegato ad una punta per aspirazione tramite un flessibile in polietilene che attraversa un filtro o all'interno di una provetta conica da 50 ml per la raccolta del liquido follicolare contenente gli oociti. La soluzione di base utilizzata per questa procedura è una fisiologica con tampone di fosfato (PBS) con 10% di siero bovino, antibiotici ed eparina.

Utilizzando il metodo dell'aspirazione è possibile recuperare oociti dal 60-70% dei follicoli di dimensioni medio-grandi in cui la tecnica è stata eseguita, con una media che va da 3 a 10 oociti per ciascuna donatrice non stimolata. Di norma le aspirazioni vengono effettuate una volta alla settimana, ma alcuni autori le hanno effettuate anche due volte alla settimana per periodi fino a tre mesi in vacche da latte senza effetti collaterali per le donatrici. La produzione di embrioni *in vitro* di norma fornisce da 1 a 3 embrioni pronti per il trasferimento per ciascuna procedura di raccolta degli oociti da donatori non stimolati.

La gravidanza nel bovino

Un ulteriore problema relativo agli animali d'allevamento di grande taglia riguarda i lunghi periodi di gestazione rispetto a quelli di cani e gatti; inoltre questi animali non producono embrioni durante la gestazione. Tuttavia vacche e cavalle proseguono nello sviluppo dell'ondata follicolare nella fase iniziale e centrale della gestazione. Uno degli obiettivi ha consistito proprio nel trarre vantaggio dallo sviluppo di queste popolazioni follicolari ovariche, tentando di produrre progenie tramite tecniche di IVF a partire da oociti prelevati da queste femmine durante la gravidanza.

La principale preoccupazione in questo caso era che la procedura di aspirazione degli oociti potesse influenzare negativamente le gravidanze in corso. È necessario evitare di danneggiare il tessuto luteinico esistente durante la procedura TUGA. La metodica di aspirazione degli oociti non si è dimostrata un problema durante la gravidanza (Figura 1) e, a tutt'oggi, le donatrici di oociti gravide, sia vacche, sia cavalle, hanno dato alla luce progenie vitale, a termine e senza complicanze.

I primi capi prodotti a partire da oociti raccolti tramite aspirazione transvaginale sotto guida ecografica da donatrici gravide sono stati ottenuti da vacche (Meintjes *et al.*, 1995b) e da cavalle (Cochran *et al.*, 1998) presso il nostro centro. La procedura TUGA viene di norma svolta fino a tre volte durante il primo trimestre di gestazione nelle femmine da carne e da latte. La percentuale di recupero degli oociti è di norma tra il 45 ed il 60% dei follicoli aspirati da vacche nei primi stadi della gravidanza.

Il principale fattore limitante nello svolgimento delle procedure TUGA è rappresentato dal peso dell'utero gravido che trascina l'ovaio nella cavità addominale. Nel corso degli anni si è rilevato che le vacche da carne donatrici gravide trattate con FSH spesso producono una maggiore quantità di oociti vitali per ciascuna raccolta rispetto a vacche con ciclo naturale simili della stessa mandria e non gravide. Una dose totale di 40 mg di FSH-P (nell'arco di 3-4 giorni) per donatrici gravide ha sempre comportato una adeguata sovrastimolazione ovarica (da 25 a 40 follicoli per femmina) in tutte le donatrici di razze da carne gravide in buone condizioni al momento del trattamento con gonadotropina.

Nelle mani di un operatore esperto la percentuale di recupero degli oociti da cavalle gravide può variare dal 50 al 75%. Nel primo lavoro sull'aspirazione degli oociti in cavalle gravide (Meintjes *et al.* 1993), la TUGA è stata eseguita su 10 cavalle di razza mista a partire dal ventesimo giorno di gestazione, proseguendo fino al centosessantesimo giorno. Il numero di aspirazioni effettuate per ciascuna cavalla variava da 3 a 7, con una media di 4,8 aspirazioni per cavalla. Il numero di follicoli visualizzati all'ecografia ed aspirati per ciascuna cavalla variava da 11 a 37, con una media di 21,3 follicoli aspirati per ciascuna cavalla. Il numero di oociti recuperati per ciascuna cavalla variava da

4 a 22, con una media di 12,4 oociti per cavalla, con un tasso totale di recupero di oociti del 58% per cavalla.

Poiché le metodologie della IVF non sono ancora disponibili per il cavallo, gli oociti prelevati dalle migliori cavalle vengono sottoposti ad iniezione intracitoplasmatica di sperma (ICSI) oppure vengono inseriti negli ovidotti della cavalla per l'inseminazione artificiale e la monta naturale. Queste metodologie vengono utilizzate in cavalle presso diversi centri equini in America settentrionale.

Applicazioni della procedura di aspirazione degli oociti

Per ottimizzare il potenziale riproduttivo dei migliori capi dal punto di vista genetico sono ancora necessari numerosi studi che permettano di apprendere come meglio utilizzare le tecniche di riproduzione assistita. Con il miglioramento e la ripetibilità delle tecnologie di recupero degli oociti è probabile che queste diverranno procedure di routine per il prelievo di oociti per ulteriori ricerche su gameti ed embrioni; i risultati saranno utili anche ai produttori di bovini da riproduzione per la produzione di embrioni *in vitro* da animali d'allevamento nel settore commerciale. Attualmente l'aspirazione transvaginale di oociti sotto guida ecografica viene utilizzata per prelevare i migliori oociti di razze minori di animali d'allevamento, da femmine domestiche con linee di sangue rare, da femmine clinicamente non fertili e da vacche con senescenza riproduttiva (Lindsay *et al.*, 1994; Looney *et al.*, 1994). Presso il nostro ed altri laboratori proseguono le ricerche di possibili applicazioni di questa tecnologia, incluso il prelievo di oociti da femmine con lesioni fisiche, da capi con malattie terminali e da giovenche giovani in età prepubere per la produzione di embrioni *in vitro*. La procedura TUGA su vitelle in età prepubere richiede l'utilizzo dello stesso piccolo trasduttore utilizzato per l'aspirazione degli oociti in medicina umana. Sebbene i ricercatori nutrissero forti aspettative nei confronti della produzione di embrioni tramite IVF e TUGA per manze da carne e da latte in età prepubere, i risultati conseguiti sono stati deludenti. Le femmine giovani rispondono al trattamento con FSH-P e con l'esperienza l'operatore può prelevare gli oociti di queste manze. Gli oociti producono embrioni ottenuti tramite IVF di aspetto vitale (di norma <20% blastociti) ma i tassi di gravidanza dopo il trasferimento nel recettore sono nella maggior parte dei casi estremamente bassi. Di norma non si ottiene progenie tramite tecniche di IVF da una manza da latte donatrice fino all'età di tre mesi. Il tasso di successo della gravidanza tende ad aumentare gradualmente con il crescere dell'età della manza.

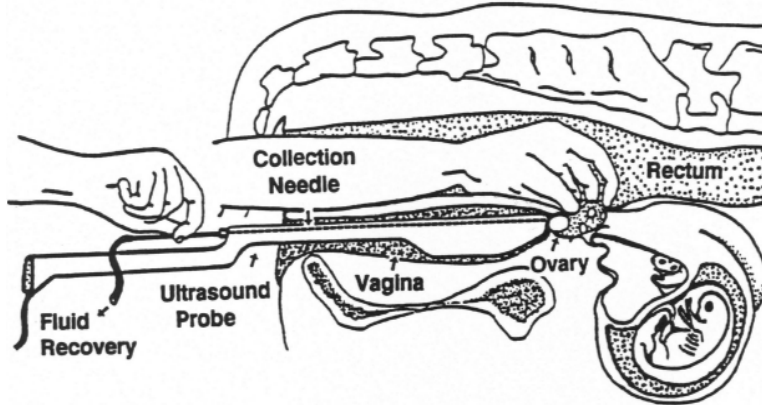
Presso il nostro laboratorio le ricerche si sono concentrate sul prelievo di oociti tramite TUGA per la IVF in vacche da carne in fase precoce postparto (Perez *et al.*, 2000, 2001). Sebbene si affermi da tempo che gli oociti di vacche da latte e da carne nella fase precoce postparto non siano adeguati per la produzione di embrioni, sembra che la realtà sia diversa. Attualmente si procede utilizzando tecniche di riduzione follicolare e due trattamenti con FSH e prelevando gli oociti due volte prima dell'inseminazione artificiale o della monta naturale. I risultati ottenuti fino ad ora indicano che gli oociti prelevati tramite TUGA utilizzando questo protocollo postparto possono produrre con successo blastocisti tramite IVF e progenie vitale sia in capi da carne, sia in capi da latte. In effetti le vacche da latte e da carne postparto possono essere trattate con un protocollo che prevede quattro giorni di FSH a partire dal quinto giorno postparto con il prelievo di oociti vitali al nono o decimo giorno postparto per la produzione di embrioni *in vitro*.

L'obiettivo generale alla base dell'utilizzo di due o tre protocolli di trattamento con FSH all'inizio dell'intervallo postparto con il prelievo degli oociti due o più volte prima dell'inseminazione artificiale o della monta naturale consiste nel produrre da uno a tre vitelli extra (dallo stesso toro o da tori differenti) oltre ad un vitello "naturale" per ciascuna vacca durante ciascuna stagione riproduttiva. In questo momento la ricerca si sta concentrando sull'utilizzo dell'aspirazione degli oociti sotto guida ecografica allo scopo di ottenere oociti per la produzione di embrioni *in vitro* come supporto per la conservazione del germoplasma di specie bovine esotiche in pericolo di

estinzione. Purtroppo per la maggior parte di queste specie non sono state sviluppate tecniche di IVF.

Figura 1. Aspirazione transvaginale di oociti sotto guida ecografica da una vacca da carne a 55 giorni di gestazione. Disegno del Dr. E. Meintjes; copyright Meintjes *et al.*(1995b).

Figure 1 - Transvaginal ultrasound-guided oocyte aspiration from a beef cow at 55 days of gestation. Drawing by Dr. E. Meintjes and copyright from Meintjes *et al.*(1995b).



BIBLIOGRAFIA - REFERENCES

- Bak, A., Greve, T., and Schmit, M. 1989. Effect of superovulation on reproduction. *Theriogenology* 31:169 (abstr.).
- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., and Dressel, M.A. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147 (abstr.).
- Chang, M.C. (1959). Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* 184:466-467.
- Cochran, R., Meintjes, M., Reggio, B., Hylan, D., Carter, J., Pinto, C., Paccamonti, D., and Godke, R. A. (1998). Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J. Equine Vet. Sci.* 18:736-740.
- Lindsay, B.R., Looney, C.R., Funk, D.J., Faber, D.C., Gue, C.S., and Kreamer, A.J. (1994). The effect of apparent dominant follicle removal prior to FSH treatment on superstimulated response in problem cows. *Theriogenology* 41:238 (abstr.).
- Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L., and Johnson, D.L. (1994). Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41:67-72.
- Meintjes, M., Bellow, M.S., Paul, J.B., Broussard, J.R., Li, L.Y., Paccamonti, D., Eilts, B.E. and Godke, R.A. (1995a). Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod. Monogr.* 1:281-292.
- Meintjes, M., Bellow, M.S., Broussard, J.R., Paul, J.B., and Godke, R.A. (1995b). Transvaginal aspiration of oocytes from hormone treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.* 73:967-974.
- Perez, O., Boediono, A., Ferguson, E., Airhart, C., Richards III, R., and Godke, R. A. (2001). Oocyte and embryo production from FSH-treated postpartum beef cows shortly after calving. *Theriogenology* 55:516 (abstr.).
- Perez, O., Richards III, R., Green, H.L., Youngs, C.R., and Godke, R.A. (2000). Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH-treated postpartum beef cows. *Theriogenology* 53:364 (abstr.).

TRANSVAGINAL OOCYTE ASPIRATION AND *IN VITRO* FERTILIZATION IN BEEF CATTLE

Godke R. A., Bondioli K. R.

ABSTRACT - With IVF the potential exists for more embryos to be produced in a shorter period of time, because the transvaginal ultrasound-guided aspiration procedures can be repeated on the same cow 3 to 4 times or more a month. The use of TUGA and IVF procedure offers an alternative to cattle producers who have genetically valuable females that are unable to produce viable embryos through standard embryo collection procedures. This gamete technology can be used on oocytes harvested from older acyclic or nonovulating animals, females with physical injuries (e.g., broken leg) and problem cows having an abnormal cervix. Good success has been reported using IVF procedures on oocytes obtained from supplemental follicles of cows with cystic ovarian disease. Currently, TUGA is now being used to harvest oocytes from domestic females representing rare bloodlines and reproductively senescent cows. Research continues to find applications for this technology, including harvesting oocytes from prepubertal heifers for *in vitro* embryo production. We are harvesting oocytes from early postpartum (<15 days) beef and dairy cattle, well before the females begins their reproductive cycle. The approach provides an opportunity to produce one or more extra calves from the cow before she is mated to establish a natural pregnancy. Also, more oocytes are often harvested from early pregnant cow than from cyclic females. This approach would allow the pregnant female to produce her own natural-birth offspring each year in addition to allowing her to produce extra transplant offspring from IVF, embryo culture and recipient transfer procedures.

INTRODUCTION

New assisted reproductive technologies are continuing to be developed for the livestock industry. Some of these technologies are more mechanical than biological in nature. For example, ultrasonography was developed initially in the livestock industry to evaluate muscle mass in the live animal. With modifications, primarily in the probe structure and software, ultrasound technology has become an important multi-use instrument for the livestock producer. Today, ultrasound units are used to evaluate the ovaries for follicle development of cattle prior to artificial insemination and after artificial insemination to determine if the female ovulated. Ultrasonography is also used in pregnancy testing, including detecting fetal heart beats (after 21 days of gestation) and sexing the fetus during the first trimester of pregnancy. More recently, ultrasonography has been used in developing a method of harvesting oocytes from donor cattle.

Embryo transfer (ET) was one of the first technologies that became available since artificial insemination to help enhance the reproductive potential of the female. With ET, females are superovulated with hormones so that their ovaries ovulate more than one ovum prior to the time of fertilization. Since the mid-1970s, nonsurgical embryo transfer technology has been used to increase the number of possible offspring from selected females, however, there are still *drawbacks* associated with this approach. For example, some females simply do not respond or stop responding to the stimulatory agents, or develop physiological conditions that make it difficult retrieving the embryos. One of the major concerns with the overall ET procedure, however, is that cows are most often kept "open" so that they may be hormone-stimulated for subsequent embryo collections. Cows that are superovulated and collected may take 60 days or longer to become pregnant either with artificial insemination or natural mating (Bak *et al.*, 1989). A small percentage of hormone-treated donors may also develop cystic follicles on their ovaries.

***In Vitro* Fertilization**

The advent of *in vitro* fertilization (IVF) techniques has now begun to change animal reproductive management. This technique was first successfully used to produce offspring in rabbits (Chang, 1959), and the first farm animal produced by IVF was a healthy bull calf by Brackett *et al.* (1982). Although years of research have been conducted in this area, today IVF methodology is still being tested and fine-tuned for the farm animals.

Initial *in vitro* embryo production (IVP) utilized oocytes collected from slaughterhouse ovaries. This worked well during early experimentation, when large numbers of immature oocytes were necessary to develop these *in vitro* laboratory procedures. In the 1980s it was proposed that the application of IVP in animals would likely be used in rare exotic animals and more commonly in genetically valuable seedstock. Although producing IVF embryos in the laboratory sparked much interest within the livestock community, not knowing the genetic origin of the oocytes used in making the IVF embryos made this new technology unacceptable to the livestock producers.

Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Aspiration

Early attempts at retrieving oocytes from potential donor cattle included surgical and less invasive laparoscopic procedures, but there was a limit to how many procedures could be performed safely without causing injury to the donor animal. At this stage, there was essentially no safe, repeatable method of harvesting the oocytes from live farm animals. Then in the late 1980s, a method was developed in humans for retrieving oocytes using ultrasonography to visualize the ovary while a needle was guided transvaginally into the follicle. Thus, the oocyte could be aspirated from the follicle and subjected to *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and then *in vitro* culture procedures.

These efforts *paved the way* for the new reproductive technology now available for farm animals. The use of ultrasonography allows the ovarian structures to be visualized on video monitor. Follicles are identified as black (hypoechoic) circular shapes on the monitor screen. Currently, transvaginal ultrasound-guided oocyte aspiration (TUGA), also known as ovum pick-up (OPU) in human medicine, is now used in cows, goats, mares and more recently in pigs and exotic hoofstock species.

Cyclic Cattle

In cattle, the donor female is restrained in a suitable holding chute and administered an epidural block. A convex ultrasound 5-megahertz (MHz) sector transducer is fitted onto the distal end of a specially-fitted 500-mm plastic handle to visualize the ovaries on the screen of the ultrasound monitor. The plastic handle (with a latex protective covering) is inserted into the vaginal canal, and then the ovary is grasped *per rectum* and placed against the transducer.

An 18-gauge, 55- or 60-cm long needle is inserted through the needle guide in the plastic handle. This needle is connected to a suction pump by means of polyethylene tubing, passing through an embryo filter or into a 50-ml conical-shaped test tube for collection of the follicular fluid containing the oocytes. The basic solution used for this procedure is phosphate-buffered saline (PBS) with 10% bovine serum, antibiotics and heparin added to this medium.

Using this aspiration method, 60 to 70% of the medium- to large-size follicles punctured result in oocytes recovered, with an average of 3 to 10 oocytes per nonstimulated donor female. Aspirations are usually performed once-a-week, but have been reported to have been performed twice-a-week for up to 3 months in dairy cows, with no adverse effects reported for the donor females. *In vitro* production of embryos generally results in 1 to 3 embryos for transfer per oocyte collection procedure for nonstimulated donors.

Pregnant Cattle

Another problem with the larger farm animals facing the reproductive physiologists is that their gestation periods are long in comparison with those of dogs and cats, and that these animals are out of embryo production during their gestation. However, both cows and mares are known to continue follicle wave development during early to mid-gestation. One objective has been to take advantage of these developing ovarian follicle populations, and attempt to produce IVF-derived offspring from oocytes harvested from these females during pregnancy.

The main concern was whether the oocyte aspiration procedure would affect the ongoing pregnancies. Care should be taken not to damage existing luteal tissue during the TUGA procedure. This oocyte aspiration approach proved not to be a problem during pregnancy (Figure 1), and to date, pregnant cow and mare oocyte donors have given birth to viable offspring at full term without complications.

The first offspring produced from oocytes collected by transvaginal ultrasound-guided aspiration from pregnant donor animals resulted from cows (Meintjes *et al.*, 1995b) and horses (Cochran *et al.*, 1998) at this station. The TUGA procedure is usually conducted up to three times during the first trimester of gestation in beef and dairy females. The oocyte recovery rate is expected to be between 45 to 60% of the follicles aspirated from early pregnant cows. The weight of the pregnant uterus drawing the ovaries into the abdominal cavity becomes the final limiting factor to conducting TUGA. Over a several year period, it was noted that FSH-treated pregnant donor beef cows often produced more viable oocytes per collection than similar nonpregnant, cyclic females from the same herd. A total dose of 40 mg of FSH-P (over 3 to 4 days) per pregnant donor has consistently resulted in good follicular superstimulation (25 to 40 follicles per female) across pregnant beef donors that were in good body condition at the time of gonadotropin treatment.

The oocyte recovery rate from pregnant mares for the experienced operator can range from 50 to up to 75%. In the initial report on oocyte aspiration in pregnant mares (Meintjes *et al.* 1993), TUGA was performed on 10 mixed breed mares starting after day 20 of gestation and continued until 160 days of pregnancy. The number of aspirations conducted per mare ranged from 3 to 7 collections, with a mean of 4.8 aspirations per mare. The number of follicles visualized via ultrasonography and aspirated per mare ranged from 11 to 37, with a mean of 21.3 follicles aspirated per mare. The number of oocytes recovered per mare ranged from 4 to 22 oocytes, with a mean of 12.4 oocytes per mare for an overall oocyte recovery rate of 58% per mare.

Since IVF methodologies are not yet available for the horse, the oocytes harvested from valuable mares are subjected to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or placed into the oviducts of recipient mares for artificial insemination and natural mating. These approaches are now being used for client mares at various equine units in North America.

Application of the Oocyte Aspiration Procedure.

There is still much to be studied and learned in the use of assisted reproductive technologies to maximize reproductive potential in genetically valuable animals. Now that repeatable oocyte retrieval methods are being fine-tuned, it is likely these procedures will become routinely used to obtain oocytes for further gamete and embryo research and also by seedstock producers for *in vitro* embryo production from farm animals in the commercial sector. Currently, transvaginal ultrasound-guided oocyte aspiration is now being used to harvest valuable oocytes from minor farm animal breeds, from domestic females representing rare bloodlines, clinically infertile females and reproductively senescent cows (Lindsay *et al.*, 1994; Looney *et al.*, 1994).

Research continues in our laboratory and others to find applications for this technology, including harvesting oocytes from injured females, terminally ill animals and young prepubertal heifers for *in vitro* embryo production. The TUGA procedure on prepubertal calves requires the small human transducer used for oocyte aspiration in the human. Researchers had high expectation for TUGA

and IVF embryo production for both prepubertal dairy and beef heifers, however, the overall results have been disappointing. The young females do respond to FSH-P treatment and with experience the operator can harvest oocytes from these heifers. The oocytes will produce viable appearing IVF-derived embryos (usually <20% blastocytes) but most report very low pregnancy rates following recipient transfer. Generally, IVF-derived offspring are not produced from a dairy heifer donor female until she is 3 months-of-age. The pregnancy success rate tends to increase gradually as the donor heifer's age increases.

Efforts have been made at our laboratory to harvest oocytes by TUGA for IVF in early postpartum beef cows (Perez *et al.*, 2000, 2001). Although it has been long proposed that the oocytes from early postpartum beef and dairy cows were nonviable for embryo production, it turns out this is not the case. Using follicle reduction and two FSH treatments and harvesting oocytes twice before artificial insemination (AI) or natural mating is now being used. Results to date indicate that the oocytes harvested by TUGA using this postpartum protocol can successfully produce IVF-derived blastocysts and viable transplant offspring in both dairy and beef cattle. In fact, postpartum dairy and beef cows can be treated with the FSH protocol (4-days) starting on day 5 postpartum and viable oocytes harvested on day 9 or day 10 postpartum for *in vitro* embryo production.

The overall objective of using two or three FSH treatment protocols during the early postpartum interval and harvesting the oocytes two or more times prior to AI or natural mating is to produce 1 to 3 extra calves (from the same or different sires) in addition to a natural calf per cow during a single breeding season. Efforts are now being made to use ultrasound-guided oocyte aspiration to obtain oocytes for *in vitro* embryo production to aid in germplasm preservation of endangered exotic bovine species. Unfortunately, the IVF methodologies have not been developed for most of these species

