

L'embryo transfer nel cavallo

EQUINE EMBRYO TRANSFER

by Domenico Bergero & Cynthia Préfontaine
■ photos by Shary B. Akers, Ali Almimaar

Introduzione

L'embryo transfer (ET) è una tecnologia di riproduzione che prevede il prelievo di un embrione da una fattrice donatrice per essere impiantato in un'altra cavalla (la ricevente) per svilupparsi fino al momento del parto. Il liquido che contiene l'embrione prelevato dalla donatrice può essere trasferito in una fattrice più giovane o geneticamente di minor pregio e sana dal punto di vista riproduttivo. L'ET è considerato riuscito quando è possibile stabilire e portare avanti la gravidanza fino alla nascita di un prodotto vivo, che presenta il patrimonio genetico dato dallo sperma dello stallone e dall'ovulo della fattrice.

Per quanto riguarda l'applicazione nei cavalli, la spe-

Introduction

The embryo transfer (ET= embryo transfer) is a breeding method or reproductive technology, where an embryo is flushed from a donor mare and implanted into another (recipient) mare for development and foaling. The liquid containing the embryo collected from the donor mare can be transferred into a younger or genetically lower mare (recipient), healthy in terms of reproduction. ET is considered successful when the pregnancy can be established and maintained, resulting in the birth of a live offspring having the donor's genetic background of the stallion's sperms and mare's ovum.

For the equine field, the all story had begun in Cambridge with the participation of 'Twink' Allen in the early 1970s. However, the first successful reported foal produced by ET





rimentazione dell'ET ha avuto inizio nei primi anni Settanta a Cambridge con il dottor "Twink" Allen, sebbene il primo puledro nato vivo con questa tecnica sia stato ottenuto nel 1974 in Giappone, con il metodo chirurgico, da Oguri e Tsutsumi. Il primo puledro ottenuto dal trasferimento di un embrione congelato nacque sempre in Giappone nel 1982, ad opera dell'equipe del dott. Yamamoto. A partire dal 1985 si sono susseguiti una serie di convegni sul tema dell'ET che si tengono a scadenza quadriennale e i cui atti vengono pubblicati come supplementi all'Equine Veterinary Journal e, più recentemente, dalla Fondazione Havemeyer. Negli ultimi trent'anni si è assistito a un'evoluzione costante della tecnica dell'ET e delle tecnologie ad esso collegate come la superovulazione, il congelamento degli embrioni, la fecondazione in vitro (IVF), il trasferimento di ovociti, il trasferimento intratubarico dei gameti (GIFT), e il congelamento degli ovociti. Oggi il prelievo e il trasferimento di embrioni freschi e congelati è consentito per la maggior parte delle razze. I paesi in cui questa tecnica è più diffusa sono Stati Uniti (circa 1500 puledri all'anno), Argentina, Brasile e, in maniera minore, Australia, Canada, Italia, Germania e Francia.

LO SVILUPPO

Molte sono le motivazioni che possono spingere a optare per la tecnica dell'ET nel cavallo:

had been observed in 1974 in Japan, surgically, by Oguri and Tsutsumi. The first foal resulting from the transfer of a frozen-thawed embryo was also born in Japan in 1982 under the care of Yamamoto and his team. Then, a series of conferences on equine ET was initiated in 1985 and has been held every 4 years since, with proceedings published as supplements to the Equine Veterinary Journal and, more recently, by the Havemeyer Foundation. Since the last three decades, the developing of ET and associated technologies as super ovulation, embryo freezing, in vitro fertilization (IVF), oocyte transfer, gamete intrafallopian tube transfer (GIFT), and oocyte freezing had never stop growing. Today, the collection and transfer of fresh and cooled embryos are permitted in most breeds. As countries strongly involved in equine embryo transfer we can mention: United States (~1500 foals/years), Argentina, and Brazil and some others with less extend like Australia, Canada, Italy, Germany, and France.

DEVELOPMENT

Many arguments can explain the attraction in using equine ET. For example:

*Show and performance mares can still compete;
Increasing ecological fitness (foals/mare/lifetime);
Older mares with or without poor reproductive histories (unable to foal) can now foal;
Represent an alternative solutions for high genetically mares unable bring a foal to term or passing through the*

- il fatto che cavalle sportive o da show possono continuare l'attività agonistica;
- la possibilità di aumentare la cosiddetta ecological fitness (adeguatezza ecologica, rapporto puledri/fattrice/età);
- anche le fattrici più anziane che abbiano incontrato difficoltà nella riproduzione (incapacità di figliare) finalmente possono riprodursi;
- rappresenta una soluzione alternativa per fattrici di elevato potenziale genetico che però non sono in grado di portare a termine la gravidanza o il parto;
- permette di pianificare un ambiente intra- ed extrauterino migliore con conseguenze sul profilo genetico e ottenere la massima produzione di latte;
- riduce lo stress a cui alcune fattrici sono sottoposte durante la gravidanza;
- permette di preservare la diversità genetica e la qualità anche in futuro, grazie al congelamento degli embrioni;
- costituisce una risorsa per allevatori di specie equine esotiche;
- permette di ridurre i costi legati al processo riproduttivo grazie alle minori spese per trasportare gli embrioni rispetto alle fattrici;
- riduce i timori legati alla prevenzione delle malattie a livello internazionale.

Come funziona l'ET?

Dal punto di vista pratico, per ottenere buoni risultati da un programma di ET nei cavalli è necessario seguire alcune fasi fondamentali e per ciascuna di esse è necessario porsi degli importanti quesiti. Scegliere, valutare e garantire la salute riproduttiva delle donatrici e delle riceventi.

Quali fattrici sono più adatte a diventare donatrici?

La donatrice ideale è una fattrice di elevato potenziale genetico, giovane, che goda di buona salute e forma fisica, con ciclo regolare e che non presenti anomalie riproduttive. Se anche uno solo di questi requisiti non dovesse essere pienamente soddisfatto, è necessario effettuare degli accertamenti e trattare eventuali anomalie prima di dare avvio al processo. Va pertanto ricordato che il tentativo di prelevare un embrione da una fattrice anziana, sterile o interessata da disturbi riproduttivi presenta minori possibilità di riuscita. In questo caso la decisione di procedere comunque dipenderà dal potenziale valore dell'eventuale puledro che si potrà ottenere.

Quali fattrici sono più adatte a diventare riceventi?

La scelta della fattrice ricevente è con ogni probabilità il fattore che influisce maggiormente sul tasso di gravidanza. Le riceventi dovrebbero essere cavalle giovani (dai cinque ai dieci anni), complessivamente in buono stato di salute, avere una storia riproduttiva, non aver mai sofferto di infezioni uterine e possibilmente

parturition's process;

Plan for optimal intra (genetic profile) -and extra-uterine (maximum milk production) environment;

Not as stressful (some mares get stressed when pregnant);

Conserving genetic diversity and quality for the future by freezing the embryos;

Help for the breed of exotic equids;

Diminish the breeding process cost considering the significant lower price of transporting embryos than live mares overseas;

Decrease international concerns linked with disease control.

What is involved in ET

From a practical point of view, to obtain positive results in a horse's program for ET, many all-fundamental steps need to be accomplished. Then, while considering those steps, important questions need to be answered. Choose, evaluate and ensure the reproductive health of both donor and recipient mares.

What kind of mare makes a good embryo donor?

The ideal embryo donor is a mare with a high genetic potential, young, healthy, in good physical shape, normally cycling and free of reproductive abnormalities. If a negative answer is given for one of these conditions, examination must be performed and any abnormalities treated before starting the process. So, to attempt embryo recovery from old, barren mares or mares with reproductive disorders, we have to be aware that probability of success will be decreased. The decision to proceed in this situation should depend on the potential value of any foal that may result.

What kind of mare makes a good embryo recipient?

The choice of the recipient mares is probably the most critical factor affecting pregnancy rates. Recipients mares should have a good general health, be young (five to ten years of age), have a breeding record, have no history of uterine infection and ideally be larger than the donor to provide a largest uterus and maximize foal birth weight.

In a recent study, Carnevale and her team discussed that the most important factors in selecting the recipient are the tone of the uterus and tone of the cervix prior to embryo transfer. Mares that have excellent uterine and cervical tone have higher pregnancy rates than recipients with marginal uterine and cervical tone. The same Carnevale team in 2003 also reported that the transfer of in vivo-matured oocytes from young, healthy mares into a recipient's oviduct results in a 70-80% pregnancy rate compared with a 30-40% pregnancy rate when the oocytes are from older, sub fertile mares.

Synchronize the ovulation stage of the uterus into which the embryo is transferred (recipient mare) with the uterus from which it was collected (donor mare).

di corporatura più grande rispetto alla donatrice, in modo da offrire un utero più grande e consentire al puledro di raggiungere il massimo peso al momento della nascita.

In uno studio recente, Elaine Carnevale e la sua equipe hanno sostenuto che il fattore più importante nella selezione della ricevente è il tono dell'utero e della cervice prima del trasferimento embrionale. Le fattrici che presentano un tono uterino e cervicale eccellente hanno tassi di gravidanza superiori rispetto alle riceventi che ne hanno invece un livello ridotto. Sempre la dott. sa Carnevale e la sua equipe nel 2003 hanno osservato che il trasferimento di ovociti di fattrici giovani e sane maturati in vivo nell'ovidotto di una ricevente portano alla gravidanza nel 70-80% dei casi, a fronte di una percentuale di gravidanza del 30-40% nel caso di ovociti prelevati da cavalle più anziane e subfertili.

Sincronizzare la fase di ovulazione dell'utero in cui l'embrione sarà trasferito (ricevente) con quello da cui è stato prelevato (donatrice).

Perché è necessario sincronizzare l'ovulazione?

La sincronizzazione della fase di ovulazione è necessaria affinché l'ambiente uterino e i livelli di ormoni della ricevente devono essere molto simili a quelli della donatrice. Generalmente per ottenere questo risultato si ricorre alla terapia ormonale (PGF2) in entrambe le cavalle, che vengono sottoposte di norma alla stessa cura, schematizzata di seguito:

Giorno 0 PGF2

Giorno 2 Può manifestarsi l'estro

Giorno 3 Estro

Giorno 4 hCG (gonadotropina corionica umana), estro

Giorno 5 Possibile ovulazione

Giorno 6 Possibile ovulazione

Giorno 7 Possibile ovulazione

Giorno 12 Prelievo e trasferimento dell'embrione

A differenza di quanto avviene nel caso dell'ET in altre specie animali, la maggior parte degli embrioni equini, come nel caso degli arabi, vengono prelevati da fattrici con singola ovulazione, dato che non ci sono prodotti disponibili in commercio per la superovulazione. Questa tecnica, che prevede la stimolazione di più ovulazioni, potrebbe dimostrarsi utile in futuro, ad esempio per ridurre il costo dell'operazione incrementando il numero di embrioni prelevati dalla stessa donatrice. Tuttavia, come affermato da Squires e la sua equipe nel 2003, la secrezione ipofisaria ricca di FSH oggi può essere utilizzata per aumentare fino a tre/quattro volte il prelievo embrionale.

INSEMINAZIONE DELLA DONATRICE

Come viene prodotto un embrione?

Why synchronize ovulation stage?

One of the main reasons to synchronize ovulation stage is that the uterine environment and the levels of hormones of the recipient uterus must be very similar to the one of the donor. To achieve this, hormone therapy (PGF2) is normally used for both, donor and recipient. They are generally treated the same and the organization is generally draft this way:

Day 0 PGF2

Day 2 Oestrus may start

Day 3 Oestrus

Day 4 hCG (human chorionic gonadotropin), Oestrus

Day 5 Ovulation may occur

Day 6 Ovulation may occur

Day 7 Ovulation may occur

Day 12 Embryo collection and transfer

Unlike ET in other species, the majority of equine embryos, as for Arabians, are collected from single ovulating mares, as there is no commercially available product for super ovulation. This method involving induction of multiple ovulations could be useful in future for example to diminish the cost of the operation by increasing the number of embryos recovered per donor. However, like Squires and co-workers stated in 2003, pituitary extract rich in FSH, can be used today to increase embryo recovery three- to four-fold.

INSEMINATION OF THE DONOR

How is an embryo produced?

Through the breeding season, the mare's reproductive cycle has a predictable length of approximately 21 days. A follicle is developed on the mare's ovaries. During the mate period, follicle (sometime two) grows, matures and releases an ovum in the uterine tube which can be fertilized by the stallion sperm, naturally or artificially, resulting in a zygote. Then, the zygote becomes step by step an embryo by undergoing cells division on his road for the uterus. Usually, only viable embryos are transported into the uterus. Twenty-five days after ovulation, the embryo stops to move freely and get attached to the uterine lining.

Use artificial (IA) or natural insemination?

First of all, both the donor and recipient should be teased, rectally examined and scanned by echography to ensure that they have reacted to the synchronisation programme and ovulated. No evidence in research had showed till today significative differences in term of pregnancy rate between the two methods. Actually, only practical and logistical concerns are involved in the decision. But, in either case, it is important that the time of ovulation is known within 12 hours for the program efficiency.

DONOR AND EMBRYO'S COLLECTION

When are embryos collected?

Embryo recovery is usually attempted between days 4 and 8 in the uterus of the donor mare, where day 0 is the day of ovulation. According to the idea, Carnevale's team made

Durante la stagione dell'accoppiamento, il ciclo riproduttivo della fattrice ha una durata prevedibile di circa 21 giorni. Nelle ovaie della cavalla si sviluppa un follicolo (talvolta due), che durante il periodo del calore cresce, matura e rilascia un ovulo all'interno del canale uterino che può essere fecondato dallo sperma dello stallone, attraverso la monta naturale o artificiale, e dare così origine a uno zigote. Progressivamente lo zigote si trasforma in embrione, attraverso successive divisioni cellulari durante la sua progressione verso l'utero. Generalmente solo gli embrioni vitali riescono a raggiungere l'utero. A venticinque giorni dall'ovulazione, l'embrione smette di fluttuare liberamente e si ancora alla parete uterina.

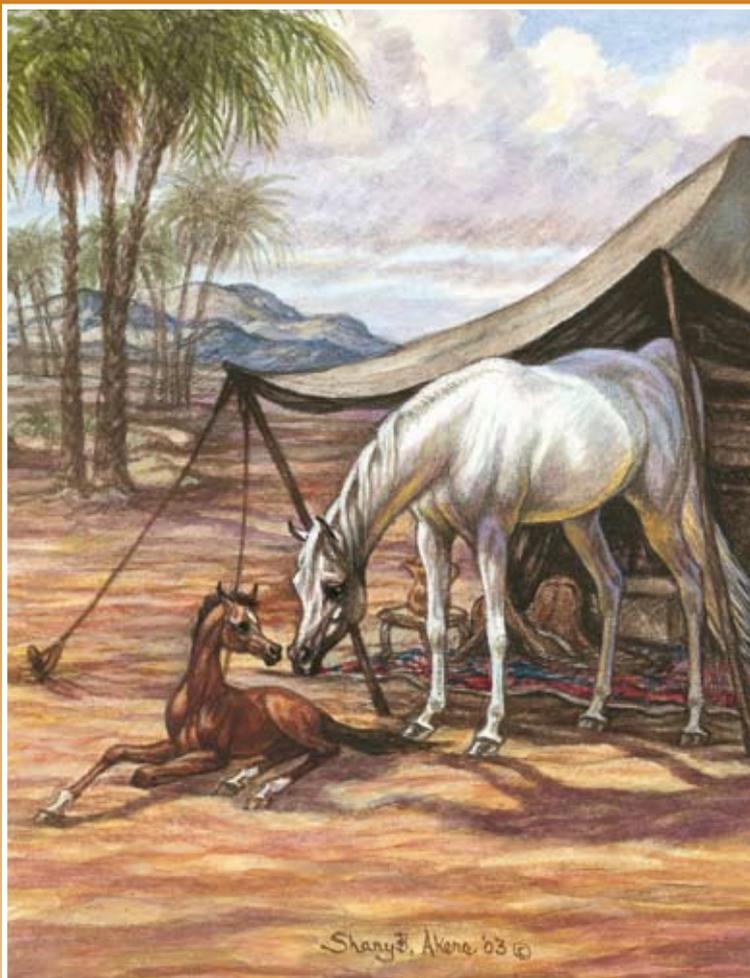
Inseminazione artificiale (IA) o naturale?

Innanzitutto sia la donatrice che la ricevente dovrebbero essere stimolate, sottoposte a un'esplorazione rettale e a ecografia per accertarsi che abbiano reagito al programma di sincronizzazione e l'avvenuta ovulazione. Ad oggi, nessuno studio ha rilevato differenze rilevanti tra i due metodi in termini di percentuale di gravidanza. In effetti la decisione dipende principalmente da considerazioni di ordine pratico e logistico. Tuttavia, qualunque sia la tecnica scelta, è importante accertare il momento dell'ovulazione entro dodici ore, perché il programma sia efficace.

LA DONATRICE E IL PRELIEVO DELL'EMBRIONE

Quando vengono prelevati gli embrioni?

Generalmente si procede al prelievo dell'embrione dall'utero della donatrice tra il quarto e l'ottavo giorno dall'ovulazione. Sulla base di questo principio, nel 2000 l'equipe della dott.sa Carnevale ha condotto uno studio su 638 embrioni equini trasferiti da cui è emerso che a sette/otto giorni dall'ovulazione, nel caso di embrioni (freschi o refrigerati) trasferiti con tecnica chirurgica o non chirurgica nelle riceventi che avevano ovulato da cinque a nove giorni prima del trasferimento, il tasso di gravidanza era del 65,7% dopo dodici giorni di gestazione, e del 55,5% a 50 giorni. La ricerca ha evidenziato altresì che i tassi di perdita dell'embrione erano notevolmente superiori nelle riceventi impiegate 7/9 giorni dopo l'ovulazione, rispetto a quelle impiegate a 5 o 6 giorni. Nel 1988 McKinnon e la sua equipe hanno osservato che i tassi di gravidanza più elevati si verificano quando la ricevente ovula o il giorno prima



in 2000 a study on 638 equine embryos transferred. They reported that 7 or 8 days after ovulation, for embryos (fresh or cooled/transported) transferred by surgical or nonsurgical techniques into recipients ovulating from 5 to 9 days before transfer, pregnancy rates was 65.7% after 12 days of gestation and 55.5% after 50. They also noted that embryo loss rates were significantly higher in recipients used 7 or 9 days versus 5 or 6 days after ovulation. McKinnon and his team in 1988 also reported highest pregnancy rates when the recipient ovulates either the day before the donor, or up to 3 days after the donor mare.

How are embryos collected surgically?

Surgical ET has to go through abdominal surgery. Mare receives general anesthesia and is laid with her ventral side up. Uterus is exteriorized through ventral midline incision in the area between the mammary gland and position of umbilical chord attachment. Uterine horn is ligated at uterine body end and a fluid is flushed from oviduct towards horn where the collection can be performed.

How are embryos collected non-surgically?

Non-surgically ET consists in a uterus wash of a pregnant mare that gives the embryo (donors). A catheter is introduced through the cervix of the donor mare and passed high



della donatrice o fino a tre giorni dopo.

Come avviene il prelievo chirurgico dell'embrione?

Questa tecnica prevede il ricorso a un intervento di chirurgia addominale. La fattrice viene posta in anestesia generale e coricata in posizione supina. L'utero viene esteriorizzato tramite un'incisione nell'area compresa tra la ghiandola mammaria e l'attaccatura del cordone ombelicale. Il corno uterino viene fissato al corpo dell'utero mentre viene iniettato un fluido nell'ovidotto verso il corno, dove si procede al prelievo.

Come avviene il prelievo non chirurgico dell'embrione?

L'ET non chirurgico avviene attraverso il lavaggio uterino (o flushing) della donatrice gravida. Viene introdotto un catetere attraverso la cervice fino a raggiungere il corno uterino, dove viene iniettato un liquido che porta con sé eventuali embrioni presenti, raccolti attraverso un tubo apposito.

Quali sono le considerazioni da fare?

La tecnica impiegata nelle prime fasi dell'embryo transfer era quella chirurgica. Oggi gran parte dei prelievi e dei trasferimenti vengono effettuati con il metodo non chirurgico (flushing) poiché implica minori

up into the uterine horn. Fluid is flushed in through the entry catheter, up into the top of the uterine horn, and then returns, along with any embryos present, via an opening into a tube for collection.

What should be considered?

The technique that had been used in the first stage of the embryo transfer was performed surgically. Today, most of the embryo collection and transfer are done in a non-surgical way (uterine wash) as it involves less danger for the donor mare; reduction of aftercare, lower operating cost and allows multiple recoveries. In another case, this choice should also consider the age of the embryo. As a matter of fact, younger embryos should be collected surgically (less than 5 days) and older ones non-surgically (more than 5 days) to increase the chances of success in both cases. Another essential point to take in account is the mare's reproductive history. As mentioned by Camillo, about only 30% embryos can be recovered from donor's mares that have uterine or oviductal pathology and 80% in the contrary. Moreover, mares inseminated with fresh and high quality semen are more likely to produce an embryo than those inseminated with cooled or frozen-thawed semen. For those reasons, a veterinarian should always verify sperm cell concentration, viability (number of live cells) mobility, and directionality of the donor stallion.

How often can embryo recoveries be performed in a season?

Embryo recoveries can be repeated on consecutive heats. To shorten the interval between collection attempts, or to concentrate collections within a particular time frame, mares can be 'short cycled' using prostaglandins. An injection of prostaglandin after the attempt of an embryo recovery will clean the mare's uterus of residual fluid, which should bring back a normal oestrus. In case of infection, the program must be stop for investigation or treatment. The numbers of recoveries not seems to affect, in this moment, the fertility of the donor's mare. We estimate today that an average of 5-8 embryos can successfully be collected per year per donor mare in case of non-surgical intervention.

Embryo evaluation and manipulation

How to evaluate the embryo?

After collection, equine embryos can be held at room temperature (35-38 °C) for 2-3 hours. At this right moment, they have to be examined and graded on a value scale from 1 to 5 (1 being excellent and 5 dead) according to the system used by the International Embryo Transfer Society. Embryos graded under 3 are rejected. They should ideally be transferred into a recipient mare or frozen as soon as possible after this manipulation.

What means an embryo of quality?

The attribution of grade is determined by embryonic factors that significantly affect pregnancy rates like: morphology grade, diameter and stage of development. So, in order, an

rischi per la donatrice, una convalescenza più rapida, minori costi legati all'intervento e consente di effettuare prelievi multipli. In altri casi, per la scelta della tecnica da impiegare si dovrebbe tenere in considerazione anche l'età dell'embrione: nelle prime fasi dello sviluppo (meno di cinque giorni) dovrebbe infatti essere prelevato chirurgicamente, mentre negli stadi più avanzati (oltre cinque giorni) si dovrebbe ricorrere al prelievo non chirurgico, per aumentare le possibilità di successo in entrambi i casi. Altro elemento essenziale da tenere in considerazione è la storia riproduttiva della fattrice. Come indicato da Camillo, è appena del 30% la percentuale degli embrioni che è possibile prelevare da donatrici che presentano un'anamnesi di patologie uterine o all'ovidotto, contro l'80% in soggetti sani. Inoltre è più probabile che fattrici inseminate con seme fresco di alta qualità arrivino a produrre un embrione rispetto a quelle fecondate con seme refrigerato o congelato. Per tale ragione, il veterinario dovrebbe verificare sempre la concentrazione di spermatozoi e il numero di cellule vive, la motilità e la direzionalità dello stallone.

Con che frequenza si può procedere a un prelievo embrionale, nell'arco di una stagione?

Il prelievo dell'embrione può essere ripetuto durante fasi di calore successive. Per ridurre l'intervallo di tempo tra i diversi tentativi o per concentrare i prelievi in una finestra temporale definita, è possibile abbreviare il ciclo della fattrici mediante l'uso di prostaglandine: un'iniezione subito dopo un tentativo di prelievo embrionale libera l'utero da eventuali residui di fluido e dovrebbe far ricomparire l'estro normale. In caso di infezione il programma dev'essere sospeso per consentire la visita e l'eventuale terapia. In questa fase, il numero di prelievi non sembra influire sulla fertilità della donatrice. Oggi si stima che sia possibile prelevare con successo una media di 5-8 embrioni all'anno per donatrice con l'impiego della tecnica non chirurgica.

VALUTAZIONE E MANIPOLAZIONE DELL'EMBRIONE

Come si valuta un embrione?

Dopo il prelievo, gli embrioni equini possono essere tenuti a temperatura ambiente (35-38°C) per 2-3 ore. È questo il momento in cui vengono esaminati e classificati su una scala da 1 a 5, dove 1 rappresenta un livello eccellente e 5 un soggetto morto, secondo il sistema utilizzato dall'International Embryo Transfer Society. Gli embrioni classificati sotto al livello 3 vengono scartati. Dopo la manipolazione, gli embrioni dovrebbero essere trasferiti nella ricevente oppure congelati nel più breve tempo possibile.

Che caratteristiche presenta un embrione di qualità?

La classificazione avviene in base a una serie di fattori che influiscono ampiamente sui tassi di gravidanza

embryo classified grade 1 with no morphological abnormalities will present less death probabilities than a grade 2 embryos with minor morphological changes or smaller than normal for his age according to Carnevale and her team. Based on data collected in the laboratory of Squires and co-workers in 2002, a 70-75% pregnancy rate can be anticipated with nonsurgical transfer of Grade 1 embryos at the initial gestation examination (Day 12) and a 65% pregnancy rate at Day 50. It is also important to remember that the recipient selection (age, day after ovulation, quality on Day 5) significantly affected pregnancy and embryo loss rates, according to Carnevale.

Can equine embryos be stored short term?

If the embryo cannot be transfer immediately in the recipient mares, he can be conserved with either short or long terms storage methods. In short term, equine embryos can be stored for up to 24 hours at 42 °C with careful regulation of temperatures and if holding in a special solution. Alternatively they can be cooled and stored successfully for 36 hours at 4-5 °C. In this case, embryos can be cooled, stored and transported in a receptacle (as used for equine semen). This method gives the advantage to ship the embryos somewhere else for transfer into recipient mares. For example, breeders and practitioners have the option, at least in the United States; to ship embryos in large stations specialized for the management of recipient mares. Carnevale and co-workers first described procedures for cooling and transporting equine embryos in 1987.

Can equine embryos be stored for long term?

Longer term storage is requires 36 hours after embryo recovery. Cryopreservation is the path used to freeze embryos. This necessitates specific control programs and storage in liquid nitrogen. It allows in fact the conservation of the embryos for many years and further their transfer into recipients mares at the appropriate stage of her hormonal cycle. Of course, this technique adds flexibility to equine embryos transfer programs as it could: allow long distance movement, help for preservation of maternal germplasm and genetic materials, increase selection pressure within an entire animal group, increase breeding line regeneration or proliferation and give tools for genetic rescue. But in the meantime, cryopreservation is young and not easy for horses. In fact, the first successful birth of a foal from a frozen embryo was achieved in 1982 by Yamamoto's team, and still need today implications in many directions. First, the majority of equine breed disapprove the registration of foals from transfer of frozen-thawed embryos. Moreover, the difficulties found with super ovulation in horse result in very few extra-embryos available to be cryo-preserved which diminish the possibilities in term of developpement. Then biologically, as reported by Legrand and others in 2000, the equine embryo is protected by a unique protein membrane called the capsule, which obstructs penetration of the cryoprotectant and makes the freezing of blastocysts and expanded blastocysts quite difficult. Most of the rese-

quali grado di morfologia, diametro e fase di sviluppo. Un embrione di livello 1 non presenta anomalie morfologiche e sarà soggetto a un minor rischio di mortalità rispetto a uno di livello 2, in cui sono stati riscontrati lievi variazioni morfologiche o dimensioni sotto la media per l'età, come indicato da Carnevale e dalla sua equipe. Sulla base dei dati di laboratorio raccolti da Squires nel 2002, si può prevedere una percentuale di gravidanza del 70-75% con il trasferimento non chirurgico di embrioni di grado 1 alla visita della gestazione iniziale (dodicesimo giorno) e un tasso del 65% al cinquantesimo giorno. Va inoltre ricordato che secondo Carnevale la selezione della fattrice ricevente (età, giorno dell'ovulazione, qualità al quinto giorno) ha un impatto significativo sulla percentuale di gravidanza e di mortalità embrionale.

È possibile conservare gli embrioni equini per un breve periodo?

Se l'embrione non può essere trasferito immediatamente nella fattrice ricevente, può essere conservato con metodologia a breve o a lungo termine. Nel caso della conservazione a breve, gli embrioni equini possono essere mantenuti fino a un massimo di 24 ore a 42°C, avendo cura di regolare attentamente la temperatura e immergendoli in una speciale soluzione. L'alternativa consiste nel refrigerarli e conservarli per le 36 ore successive a 4-5°C. Trattati in questo modo, gli embrioni possono essere trasportati in un apposito contenitore (simile a quello utilizzato per il seme) per essere impiantati nelle riceventi. Negli Stati Uniti, allevatori e veterinari possono inviare gli embrioni a stazioni di monta specializzate nella gestione delle fattrici riceventi. Le procedure di raffreddamento e trasporto sono state descritte per la prima volta nel 1987 da Carnevale e dai suoi collaboratori.

È possibile la conservazione degli embrioni equini a lungo termine?

La crioconservazione è la tecnica che permette di congelare gli embrioni: richiede protocolli di controllo specifici e la conservazione in azoto liquido. Questo metodo consente infatti di conservare gli embrioni anche per diversi anni e di procedere al trasferimento nelle riceventi al momento migliore del loro ciclo ormonale. È evidente come questa tecnica offra anche una maggiore flessibilità alla pratica dell'ET, rendendo possibile il trasporto anche sulla lunga distanza, la conservazione di germoplasma materno e materiale genetico, aumenta la pressione della selezione all'interno di un intero gruppo, incrementa la rigenerazione o proliferazione delle linee di riproduzione e offre uno strumento al salvataggio genetico. Ma allo stato attuale la crioconservazione è ancora una tecnica recente e di non facile applicazione nei cavalli. Infatti la nascita del primo puledro da embrione congelato è stata conseguita con successo nel 1982 dall'equipe del dott. Ya-

arches implicated in this field suggested better results for smaller embryos (days 6 after ovulation) than the larger embryos (days 7 after ovulation). Additional studies are needed to refine the techniques for freezing embryos collected from mares 7 or 8 d after ovulation. Non-toxic cryopreservation agent is also yet to be found. In term of actual practice, the pregnancy rate with frozen embryos is obviously lower compare with fresh transferred embryos.

Transfers of the embryo How are embryos transferred in the recipient mare?

The transfer of embryos to another equine uterus for pregnancy can be done either surgically (USA, Brazil) or non-surgically (only this one is used in Europe), which is recognizing to be the easiest and fastest method limited to embryos older than five days. Surgery, that requires a general anaesthetic, is generally used only in the transfer of young frozen embryos. In both cases, to aseptic is strictly asked to protect the mares from infections.

Requirements for ET

Requirements for ET could be different from a country to another, and can vary from time to time. For this reason, having contact with WAHO (World Arabian Horse Organization) for further informations could be necessary. Generally, an ET permit is required for each purebred Arabian mare used as a donor for embryo transfer. The required fee has to be paid. Donor mare's blood type has been placed on permanent record with the Registry. A horse that is the result of an embryo transfer may be registered. The blood type of the horse has been placed on permanent record. Often, the horse must qualify as an offspring of the stated sire and dam through blood testing. An embryo must be transferred to a recipient mare within three days of the collection from the donor mare. Only one horse registration per year is often permitted from the donor mare. If the recorded owner of the donor mare sells the embryo prior to the birth of the horse, the Certificate of Registration will be issued in the recorded ownership of the purchaser in accordance with the terms of the Embryo Sale form.

Conclusion

The need for new assisted reproductive techniques for the horse will be growing in the future for a large number of species and breeds, including Arabian horses. This will step by step change both the market and the "ethical" perception about these techniques. Some items are in fact still questionable, and need further detailed studies, for example the impact of repeated hormonal treatments on donor mares. From this point of view, equine ET has a large potential, still mostly unemployed, and it is easy to say that it will be more and more used for the different purposes listed in the first part of this article. Some knowledge is however still lacking, in particular in the cryopreservation and super ovulation areas, that will be the key point for successful commercial application of this technique. Embryo sexing could also be an important point for further large scale

mamoto e ancora oggi questa tecnica ha implicazioni di vasta portata; innanzitutto, la maggioranza delle associazioni di razza disapprova la registrazione di puledri ottenuti dal trasferimento di embrioni congelati; le difficoltà incontrate con la superovulazione nel cavallo fa sì che si possano ottenere pochissimi embrioni extra da destinare alla crioconservazione, cosa che diminuisce le possibilità in termini di sviluppo. Inoltre, come indicato da Legrand et al. nel 2000, dal punto di vista biologico l'embrione equino è protetto da una speciale membrana che impedisce al crioprotettore di penetrare e rende difficile il congelamento dei blastociti. Molte delle ricerche condotte in questo campo hanno indicato risultati migliori in caso di embrioni più piccoli (a sei giorni dall'ovulazione) rispetto a quelli più sviluppati (dal settimo giorno dall'ovulazione). È necessario approfondire gli studi per poter migliorare le tecniche di congelamento degli embrioni prelevati a 7 o 8 giorni dall'ovulazione e dev'essere ancora individuato un agente atossico per la crioconservazione. Allo stato dell'arte, la percentuale di gravidanza con embrioni congelati è decisamente inferiore rispetto a quella con il trasferimento di embrioni freschi.

IL TRASFERIMENTO DELL'EMBRIONE

Come avviene il trasferimento dell'embrione nella fattrice ricevente?

Il trasferimento degli embrioni ad un altro utero equino per la gravidanza può essere effettuato tramite tecnica chirurgica (USA, Brasile) o non chirurgica (l'unica praticata in Europa), considerata il metodo più semplice e rapido limitato a embrioni più vecchi di cinque giorni. La tecnica chirurgica richiede l'anestesia generale e viene impiegata soltanto per trasferire giovani embrioni congelati. In entrambi i casi è necessario porre la massima attenzione nel proteggere le fattrici da eventuali infezioni.

I requisiti dell'ET

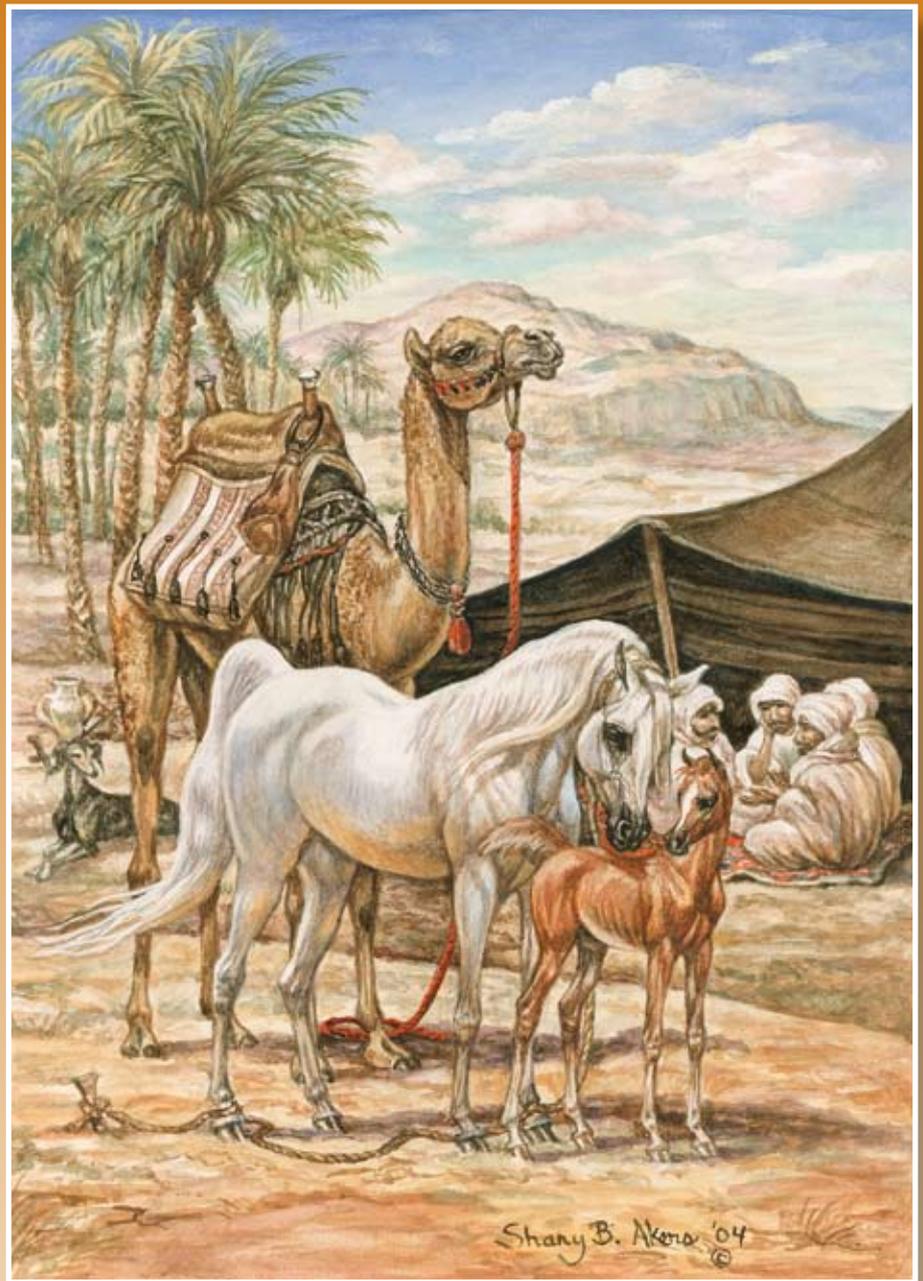
I criteri per procedere all'ET possono variare da paese a paese e a seconda della situazione specifica. Per tale ragione può essere utile consultare la WAHO (World Arabian Horse Organization) per maggiori informazioni. Di norma è necessario ottenere dietro pagamento un permesso ad effettuare l'ET per ciascuna fattrice purosangue araba impiegata come donatrice. È necessario inoltre che il gruppo sanguigno della donatrice sia registrato. Il prodotto ottenuto con l'embryo transfer può essere registrato e spesso si procede a un esame del sangue per certificare la discendenza dallo stallone e dalla fattrice dichiarati. L'embrione dev'essere trasferito nella ricevente entro tre giorni dal prelievo dalla fattrice donatrice. In genere è consentita un'unica registrazione all'anno per donatrice. Nel caso in cui il proprietario registrato della donatrice venda l'embrione prima della nascita del puledro, verrà rilasciato un certificato di registrazione di proprietà



dell'acquirente, secondo quanto stabilito dal modulo di vendita dell'embrione (Embryo Sale form).

Conclusioni

Si prevede che in futuro la necessità di nuove tecniche di riproduzione assistita aumenterà per un vasto numero di specie e razze, tra cui anche quella araba. Questo sviluppo cambierà progressivamente non solo il mercato, ma anche la percezione "etica" di queste tecniche. Sono infatti ancora presenti elementi discutibili ed è necessario approfondire le ricerche esistenti per quanto riguarda, ad esempio, i ripetuti trattamenti ormonali a cui sono sottoposte le donatrici. Da questo punto di vista, l'ET presenta un potenziale notevole, in gran parte ancora inespresso, e non è difficile prevedere che troverà progressivamente impiego per le finalità indicate nella prima parte dell'articolo. Non si dispone ancora di una conoscenza sufficientemente approfondita, in particolare per quanto riguarda la crioconservazione e la superovulazione, elementi che verranno a ricoprire un'importanza fondamentale per le applicazioni commerciali di questa tecnica. La determinazione del sesso (sessaggio) dell'embrione potrebbe rappresentare un altro elemento chiave per l'applicazione su vasta scala dell'ET nei cavalli. Ci sono diversi altri fattori che possono svolgere un ruolo importante nel futuro impiego dell'ET nei cavalli arabi, tra cui il valore dei soggetti impiegati, la performance dei puledri ottenuti con l'embryo transfer, i costi del processo, il perfezionamento delle tecniche e l'atteggiamento del settore verso l'applicazione di questo metodo. Un ultimo commento va speso sulle limitazioni alla registrazione, tuttora valide per gran parte delle associazioni di razza. È molto probabile che queste regole saranno riviste nei prossimi anni, per tenere nella giusta considerazione le basi scientifiche di questa tecnica. □



application of equine ET. Several factors can also play a pivotal role in the further use of ET for Arabian horses, including the value of the horses used, the performance of the foals produced by embryo transfer, the cost of the procedures, the refinement of the techniques and the attitude of the equine industry to its application. Just a few words about breed registration restrictions: they are still present in the rules of most breeding society. We really think that these rules will undergo a revision in the next years. The key point is to take into due account the scientific background. □

*L'embryo transfer
nel cavallo*

EQUINE EMBRYO TRANSFER