

ESPERIENZE DI EMBRYO TRANSFER (ET) NELLA CAVALLA DURANTE LA STAGIONE DI MONTA 2003

RESULTS OF EMBRYO TRANSFER (ET) IN THE MARE DURING 2003 BREEDING SEASON

TIZIANA NERVO*, *Med Vet, PhD* - **STEFANIA BUCCA****, *Med Vet*
MARIA ELENA FALOMO***, *Med Vet, PhD* - **GIOVANNA ROMANO****, *Med Vet, Dipl. ECAR*
LEILA VINCENTI*, *Med Vet, PhD*

**Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Via Leonardo Da Vinci, 44 - Grugliasco (TO)*

***Libero professionista, Torino*

****Libero professionista, Padova*

Riassunto

L'embryo transfer è una tecnologia che si sta diffondendo anche in riproduzione equina. Nel presente lavoro, si è cercato di verificare se alcuni dati anamnestici o gestionali possano avere influenzato i risultati ottenuti in stagione 2003.

Nonostante i dati raccolti siano numericamente esigui, sono state osservate buone percentuali di recupero e di trasferimento embrionale, in particolare da cavalle donatrici con un'anamnesi riproduttiva regolare ed allorquando si sono utilizzati seme fresco per l'IA e riceventi ottimali per il trasferimento.

Summary

The demands for ET in the equine species are increasing and, in order to maximize embryo recovery rates, the importance of anamnesic and clinical management data, have been analyzed.

Regularly cycling donors, fresh semen A.I. and excellent uterine status of the recipient mares seem to play the most important roles.

INTRODUZIONE

Il primo Embryo Transfer (ET) equino risale al 1972, grazie ad Oguri e Tsutsumi, i quali, nel 1980, riferirono anche del primo ET praticato per via non chirurgica. Nonostante la tecnica non abbia raggiunto lo stesso sviluppo osservato nella specie bovina, la richiesta di ET nell'equino è andata aumentando negli ultimi anni, grazie ai vantaggi ad esso collegati. Mediante questa tecnologia, una fattrice di pregio può generare più puledri in un anno senza interrompere l'attività agonistica e senza fronteggiare i rischi potenziali connessi alla gravidanza e al parto, specialmente se affrontati in età avanzata (Camillo, 2003; Squires, 1993, 1999). La tecnica di ET permette altresì di superare alcuni problemi di ipofertilità (riassorbimenti embrionali precoci, patologie legate a distocie pregresse, ecc.), pur senza essere una cura per la sterilità (Camillo, 2003). Dal punto di vista del management, richiede una

manualità consolidata, sia per la gestione clinica delle fattrici, sia per la manipolazione dell'embrione e, spesso, il difficile reperimento di riceventi idonee nella realtà nazionale risulta essere un fattore limitante (Camillo, 2003; Squires *et al.*, 1999). Non va inoltre trascurato che si tratta di una pratica costosa, anche in relazione al fatto che, al momento attuale, non sono in commercio in Italia dei principi attivi, quali l'Estratto Pituitario Equino (EPE) o l'ormone follicolo stimolante equino (eFSH) in grado di indurre la superovulazione nella cavalla. Dati bibliografici recenti (Niswender *et al.*, 2003; Squires *et al.*, 2003) riportano ottimi risultati utilizzando l'eFSH in commercio negli Stati Uniti, somministrato in combinazione con l'hCG; il costo di un trattamento con eFSH risulta essere di 400-500\$, con la possibilità di ottenere mediamente 2 embrioni/ciclo. Anche l'EPE (Alvarenga *et al.*, 2001) ha permesso di ottenere un maggior numero di embrioni/ciclo, sempre associato all'hCG. Tuttavia il numero di embrioni ottenuti

risulta sempre inferiore a quello riportato nella vacca; pare infatti (Alvarenga *et al.*, 2001) che l'infundibolo della cavalla abbia una ridotta capacità di captazione degli ovociti rispetto a quello della bovina.

Un ulteriore limite importante dell'ET è legato alla scarsa vitalità post congelamento degli embrioni equini (Squires *et al.*, 1999); per contro la refrigerazione è stata standardizzata con successo e le cellule possono essere conservate in terreno di trasporto, per 24h, senza influenzare le percentuali di gravidanza (Moussa *et al.*, 2002). Sembra che la capsula che avvolge l'embrione ne impedisca in qualche modo, non ancora ben noto, un corretto congelamento (Huhtinen *et al.*, 2000; Legrand *et al.*, 2000). Sono molte le équipes che lavorano su questo argomento al fine di mettere a punto al più presto una metodica commercializzabile che utilizzi il glicole etilenico come crioprotettore e dei supporti diversi dalle paillettes classiche, come, ad esempio, le Open Pulled Straw (OPS) (Lascombes *et al.*, 2000; Oberstein *et al.*, 2000).

Esistono ancora dei limiti legali alla diffusione su larga scala dell'ET; ad esempio, non tutte le associazioni di razza accettano puledri nati da ET o non ne accettano più di uno per stagione. Per il cavallo trotatore, è possibile iscrivere un solo prodotto per fattrice all'anno e le riceventi di ET devono essere a loro volta trotatrici non enucleate; il registro del Purosangue Inglese vieta espressamente questa tecnica, mentre per i saltatori, al momento, nel nostro Paese, non vige alcuna norma. Il regolamento della razza Quarter Horse prevede le possibilità di produrre un numero illimitato di puledri per anno e per fattrice.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare i dati raccolti in stagione di monta 2003 e valutare la correlazione tra alcuni riscontri anamnestici o gestionali ed i risultati ottenuti.

MATERIALI E METODI

Durante la stagione di monta 2003, tre équipes, che lavoravano utilizzando la stessa metodica, hanno effettuato 49 flushing su 30 cavalle donatrici. Si trattava di 10 trotter, 15 saltatrici e 5 Quarter Horse, di età compresa tra i 4 e i 20 anni. Per la maggior parte (21/30) si trattava di soggetti tra i 6 e i 15. In 16 fattrici, si è sfruttato un solo ciclo; per le altre 14, la procedura è stata ripetuta da 2 a 4 cicli consecutivi. A seconda della disponibilità, il seme è stato utilizzato fresco (46,93%), refrigerato (24,49%) o congelato (28,57%). Il momento ottimale di inseminazione è stato valutato soggettivamente dai singoli clinici in base alla loro esperienza professionale, sempre coadiuvati dal monitoraggio ecografico transrettale. Il flushing, in 42 casi (85,71%), è stato effettuato tra il giorno 7 e 7,5 dall'ovulazione; nei restanti, l'età avanzata del soggetto e/o l'utilizzo di seme congelato, hanno giustificato l'intervento all'8° giorno. Le donatrici, contenute in un apposito travaglio, sono state preparate come per un'inseminazione artificiale (IA): la coda è stata fasciata e posta di lato e la zona perineale lavata accuratamente con acqua tiepida e betadine diluito, quindi asciugata. Il lavaggio uterino è stato eseguito con 1lt di DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Solution) sterile a 37°C, addizionato di albumina bovina (4 g/lt) e antibiotici (penicillina, 50000 UI e streptomina, 500 mg/lt), introdotto nell'utero della donatrice mediante

un catetere cuffiato di silicone, disponibile in commercio. Con lo stesso litro, l'utero è stato lavato per 3-4 volte consecutive e, ad ogni lavaggio, il liquido è stato sottoposto a filtrazione, attraverso un filtro EZ-Flush® (Petf, USA) per essere immediatamente riutilizzato (Fig. 1). Non è stato effettuato alcun controllo del catetere per via rettale, né si sono eseguite manovre di "massaggio" dell'utero per favorirne lo svuotamento. Al termine di ogni flushing, la fattrice veniva sottoposta ad una singola irrigazione con 1,5-2 lt di Ringer lattato (poi filtrato ed osservato al microscopio) e trattata con una dose standard di PgF2 α . Il contenuto del filtro è stato poi osservato allo stereomicroscopio (ingrandimento 12-60X) per la ricerca dell'embrione (Fig. 2). Quest'ultimo è stato sottoposto a diversi lavaggi in PBS pulito, analogo a quello usato per il flushing, prima di essere trasferito nella paillette (Fig. 3). Sono state utilizzate paillette francesi da embrioni, contenenti un volume di 0,25 ml. L'embrione è stato caricato in una falda di PBS, separato da altre due falde di PBS tramite due bolle d'aria.

Il trapianto è avvenuto sempre a fresco per via transcervicale non chirurgica (Fig. 4). A tale scopo, le riceventi sono state condotte nel travaglio e preparate come le donatrici prima del flushing; la paillette è stata caricata nell'apposito pistolet da trasferimento di embrioni che è stato a



FIGURA 1 - Filtrazione del PBS durante il flushing.



FIGURA 2 - Ricerca dell'embrione allo stereomicroscopio.

sua volta protetto da una guaina e da una camicia sanitaria sterile. Il pistolet è stato introdotto per via vaginale nella cervice della ricevente. La camicia sanitaria in questa sede è stata lacerata; quindi il pistolet è stato spinto fino alla base del corno uterino ipsilaterale al corpo luteo, dove l'embrione è stato depositato.

Le riceventi utilizzate sono state 29, di cui 21 di meno di 5 anni e 8 di età compresa tra i 6 e i 15 anni; 17 (58,62%) erano maiden. Nella maggior parte dei casi si trattava di trottatrici; in rare occasioni sono state utilizzate delle cavalle da sella, due delle quali erano PRE (Pura Razza Spagnola). La valutazione dello stato clinico delle riceventi e, pertanto, della loro idoneità, è stata effettuata mediante visita clinica ed ecografia, con il supporto dell'esame batteriologico, citologico e bioptico dell'utero. La sincronia andava da 3gg prima a 3gg dopo rispetto alle donatrici grazie all'utilizzo di PgF2 α ed hCG. A tutte le riceventi è stato somministrato un progestinico quotidianamente (Altrenogest, 0,044 mg/kg per os) dal giorno del trapianto fino al 100°g di gestazione. La diagnosi di gravidanza è stata effettuata a 7 giorni dal transfer (14 gg dall'ovulazione della donatrice), per via ecografia transrettale, quindi confermata successivamente, fino al momento attuale, secondo i protocolli di lavoro seguiti da ciascun clinico.



FIGURA 3 - Caricamento dell'embrione nella paillette.



FIGURA 4 - Trasferimento dell'embrione nella ricevente.

RISULTATI

Complessivamente, durante la stagione di monta 2003, sono stati recuperati 28 embrioni (57,14%), tutti di grado 1 o 2 e due di grado 3. Gli embrioni sono stati valutati seguendo una scala da 1 a 5 (da ottimo a non fecondato), come descritto da Squires, a sua volta adattato da Slade (Squires, 1993).

La percentuale di riceventi positive alla diagnosi di gravidanza ecografica a 14 gg è stata del 72,41%; una sola ha evidenziato un riassorbimento embrionale al 36°g di gravidanza.

Nelle 16 fattrici per le quali si è sfruttato un solo ciclo, in 11 casi (68,75%) si è recuperato un embrione trasferibile; tra le altre 14, in un solo soggetto non si è recuperato alcun embrione, ma il seme utilizzato (refrigerato) presentava motilità progressiva inferiore al 20% entrambe le volte in cui si è effettuata l'Inseminazione Artificiale (IA).

Per quanto riguarda il tipo di seme utilizzato per l'IA, a seconda della disponibilità, si è ricorsi al fresco (46,93%), al refrigerato (24,49%) o al congelato (28,57%). Le percentuali di recupero sono state rispettivamente del 73,91%, del 41,67% e del 28,57%.

Le donatrici sono state esaminate in base all'età, al numero di ovulazioni e all'anamnesi riproduttiva.

Nella nostra esperienza, soltanto 2 delle 30 fattrici trattate si trovava in un range di età superiore ai 15aa. Una delle due era normale dal punto di vista riproduttivo, mentre l'altra aveva abortito nel mese di gennaio e presentava una biopsia uterina di grado 3 secondo la classificazione citata da Doig e Waelchli (Doig e Waelchli, 1993); nonostante ciò, sono stati sfruttati due cicli e sono state recuperate due blastocisti di grado 1. Anche dalla prima fattrice è stata ottenuta una blastocisti di grado 1, utilizzando un solo ciclo.

In due casi di tripla ovulazione della donatrice, abbiamo sempre recuperato un embrione, non così in presenza di ovulazione singola o doppia. In due casi su sette di doppia ovulazione, gli embrioni sono stati recuperati entrambi.

Le donatrici sono state ulteriormente suddivise in due gruppi: "fattrici problema" (16) e "normali" (14) dal punto di vista dell'anamnesi riproduttiva. Nel primo gruppo la percentuale di recupero è stata del 50,00%, nel secondo del 66,67%, ad ulteriore conferma del fatto che l'ET può essere una tecnica di supporto solo per alcune défaillances della sfera riproduttiva.

Per quanto concerne le riceventi, alcune di quelle risultate non gravide, avevano già evidenziato un'anamnesi riproduttiva imperfetta ed una condizione non ottimale al momento del transfer. Riguardo la loro sincronizzazione, non si è evidenziata una differenza di attecchimento, a patto che sia compresa nel range descritto (+3/-3).

Al momento del trasferimento, oltre alla condizione clinica della ricevente, anche la qualità dell'embrione svolge senz'altro un ruolo importante. Nella stagione 2003, sono stati recuperati embrioni di grado 1 o 2 (eccellenti o buoni) (Fig. 5). In due casi sono stati rinvenuti due embrioni di scarsa qualità (una morula di grado 3 ed una blastocisti con la zona pellucida danneggiata): entrambi non hanno dato origine a gravidanza. In un terzo caso l'embrione è stato danneggiato durante la manipolazione ed anche qui la ricevente è risultata negativa all'ecografia a 14 gg. Non



FIGURA 5
Blastocisti equina
di grado 1.

sembra avere rilevanza il mancato utilizzo del terreno di trasporto: nella nostra esperienza, in questo caso relativa anche alle stagioni di monta precedenti, l'utilizzo del solo PBS sembra non influenzare la vitalità dell'embrione trasferito. In tutti i casi, i tempi di esecuzione sono stati estremamente rapidi e, in un periodo di 45'-70', l'embrione era trasferito nella ricevente.

DISCUSSIONE

In linea generale, i risultati analizzati si sono rivelati estremamente eterogenei, anche a causa del numero esiguo di campioni, e pertanto non è stato possibile mettere in atto un'analisi statistica. Si è cercato comunque di comprendere se alcuni fattori, anamnestici o gestionali, potessero aver avuto una qualche influenza sull'esito del flushing.

L'età della donatrice sembra essere un fattore che influenza negativamente l'ET (Camillo, 2003; Carnevale *et al.*, 2000; Squires *et al.*, 1999); in una fattrice anziana, è più probabile osservare patologie riproduttive pregresse, oltre che una produzione fisiologica di gameti "invecchiati" che si traduce in una minor percentuale di recupero o in interruzioni precoci di gravidanza nella ricevente. Nella nostra esperienza, le due fattrici con più di 15aa di età hanno invece sempre prodotto un embrione quando sottoposte a flushing; nonostante ciò, il numero esiguo non permette di considerarle un campione significativo.

In accordo con altri Autori (Squires *et al.*, 1987; Squires *et al.*, 1999; Alvarenga *et al.*, 2001), possiamo dire di aver osservato un'influenza del numero di ovulazioni della donatrice sull'esito del recupero. In caso di doppia o tripla ovulazione della donatrice, abbiamo osservato un tasso di recupero lievemente superiore, rispetto ai casi di ovulazione singola (56% vs 52%), pur avendo rinvenuto due embrioni soltanto in due occasioni su sette.

Il tipo di seme utilizzato per l'IA sembra influenzare i risultati: possiamo osservare una resa al recupero notevolmente ridotta allorché ci si è avvalsi del seme congelato, peraltro in accordo con tutta la bibliografia presente in merito (Camillo, 2003. Carnevale *et al.*, 2000; Squires *et al.*, 1999).

Anche il dato relativo alla percentuale superiore di recupero nelle donatrici normali (66,67%) rispetto alle problematiche (50,00%) è abbastanza prevedibile: nel momento in cui si mette in atto un programma di ET commerciale,

bisogna considerare che ci stiamo avvalendo di una tecnica di supporto, non in grado di superare tutti i problemi di fertilità che possono colpire la fattrice e pertanto anche il proprietario deve esserne consapevole (Hartman, 2003).

Ripetere l'ET su più cicli, e di conseguenza manipolare più frequentemente l'apparato genitale, non sembra invece avere effetti a breve termine né sui pattern ormonali del soggetto, né sulle caratteristiche citologiche dell'endometrio; i potenziali effetti a lungo termine risultano essere ancora scarsamente noti (Macon *et al.*, 2003; Handler Squires *et al.*).

Correlando la qualità dell'embrione alla percentuale di attecchimento nella ricevente, ci siamo trovati in accordo con la bibliografia (Carnevale *et al.*, 2000; Jasko, 2002; Squires *et al.*, 1999), anche se dobbiamo considerare che solo una percentuale minima di embrioni recuperati non era di grado 1 o 2.

Per quanto concerne le riceventi, lo stato sanitario generale e dell'apparato riproduttore in particolare sono essenziali per un buon esito del transfer (Camillo, 2003; Carnevale *et al.*, 2000; Squires *et al.*, 1999). È stato osservato che la percentuale di gravidanza a 50 gg è superiore in quelle riceventi che presentavano un tono uterino buono o ottimo alla visita pre-transfer (Carnevale *et al.*, 2000). Alcuni Autori hanno osservato che potrebbero essere utilizzate come riceventi anche cavalle non sincronizzate e trattate con altrenogest (Parry-Weeks *et al.*, 1987; Pool *et al.*, 1987), cavalle già in stato di gravidanza iniziale (Camillo *et al.*, 1997), cavalle in lattazione (Taveiros *et al.*, 2003), mule cicliche (Camillo *et al.*, 2003). Tuttavia, la ricevente ideale per un embrione sembra essere una cavalla sana dal punto di vista riproduttivo, tra i 5 e i 9 anni di età, che abbia già partorito un puledro vivo e sano, che abbia attitudine materna e sia una buona lattifera e che abbia una mole somatica pari o superiore a quella della donatrice (Wilsher *et al.*, 2000). La sincronizzazione ottimale si ottiene con riceventi che hanno ovulato tra +1 e -3 o -4 rispetto alle donatrici (Carnevale *et al.*, 2000; Jasko, 2002; Squires *et al.*, 1999). Nella nostra casistica, abbiamo sempre avuto a disposizione un'unica ricevente per ET e non sempre abbiamo ottenuto una sincronia ottimale. Per questo motivo, e per standardizzare il protocollo, è stato deciso a priori di trattare tutte le riceventi con altrenogest fino al 100° giorno di gestazione. Dobbiamo riferire che, delle 10 riceventi che non rispettavano la sincronia definita dai dati bibliografici, 9 hanno comunque portato avanti la gravidanza. Carnevale *et al.* (2000) hanno osservato una perdita embrionale statisticamente superiore in riceventi che avevano ovulato tra 6 e 9 gg dopo rispetto alle donatrici.

Al momento attuale, nel nostro Paese, il reperimento di buone riceventi è senz'altro uno dei fattori limitanti la diffusione dell'ET; i soggetti utilizzabili spesso non sono molti e bisogna adattarsi alla ridotta disponibilità, utilizzando anche quelle non ottimali.

CONCLUSIONI

Dall'analisi dei dati emerge che l'ET è una tecnica ormai ben standardizzata che può fornire dei buoni risultati. Un'ulteriore svolta sarà data dalla possibilità, per ora sperimentale, di congelare gli embrioni con buoni risultati.

I dati raccolti in questa esperienza sono senz'altro paragonabili a quelli ottenuti dagli altri Autori (Camillo, 2003; Jasko, 2002; Squires *et al.*, 1999). Il numero ridotto di casi e l'eterogeneità degli stessi non ha permesso di impostare un'analisi statistica, ma abbiamo potuto evidenziare un recupero senz'altro superiore nelle fattrici sane che, pertanto, non ricorrono all'ET come "ultima possibilità" per ottenere una gravidanza.

Parole chiave

Embryo transfer, fattrice, gestione, riceventi.

Key words

Embryo transfer, mare, management, recipients.

Bibliografia

- Alvarenga MA, McCue PM, Bruemmer J, Neves Neto JR, Squires EL (2001). Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology* 15; 56 (5), 879-887.
- Camillo F, Cela M, Vannozi I, Romagnoli S, Aria G (1997). The use of early pregnant mares as embryo recipients. *Equine Vet J Suppl*, 25:77-79.
- Camillo F, Vannozi I, Rota A, Di Luzio B, Romagnoli S, Aria G, Allen WR (2003). Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. *Reprod Dom Anim*, 38, 380-385.
- Camillo F (2003). Embryo transfer nel cavallo: il punto sulla situazione. *Atti 5° Convegno Nuove Acquisizioni in materia di Ippologia*, 61-74.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga LA, Vanderwall DK, McCue PM (2000). Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, 54, 965-979.
- Doig PA e Waelchli RO (1993). Endometrial biopsy. In: Mc Kinnon AO, Voss JL, *Equine Reproduction*, Ed. Williams & Wilkins, 225-233.
- Handler JM, Königshofer M, Kindhal H, Hoppen HO, Aurich JE, Aurich C (2000). Changes of PGFM, progesterone and LH secretion patterns in relation to cycle length after cervical manipulation in mares. *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, Saari, Finland, 71-73.
- Hartman D (2003). Embryo Transfer as an integral part of today's equine practice, *Annual Conference and Symposium - Society for Theriogenology*, Columbus, Ohio, 81-84.
- Huhtinen M, Sjöholm A, Paranko J (2000). Comparison of glycerol and ethylene glycol in equine embryo freezing using confocal microscopy, dapi-staining and nonsurgical transfer. *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, Saari, Finland, 52-53.
- Jasko DJ (2002). Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. *Theriogenology*, 58, 713-715.
- Lascombes FA, Pashen RL (2000). Results from embryo freezing and post ovulation breeding in a commercial embryo transfer programme. *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, Saari, Finland, 95-96.
- Legrand E, Krawiecki JM, Tainturier D, Cornière P, Delajarraud H, Bruyas JF (2000). Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, Saari, Finland, 62-65.
- Macon KA, McCue PM, Carnevale EM, Squires EL (2003). Effect of repeated embryo collection attempts on uterine health in mares, *Annual Conference and Symposium - Society for Theriogenology*, Columbus, Ohio, 2
- Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas JF, Daels PF (2002). Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24h in Ham's F-10 and emcare holding solutions. *Theriogenology*, 58, 755-757.
- Niswender KD, McCue PM, Squires EL (2003). Superovulation in mares: initial studies on a product for commercial use, *Annual Conference and Symposium - Society for Theriogenology*, Columbus, Ohio, 44.
- Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Lane M, Seidel GE Jr, Carnevale EM, Squires EL (2000). Cryopreservation of equine embryos by OPS, Cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, Saari, Finland, 54-56.
- Oguri N, Tsutsumi Y (1972). Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *Journal of Reproduction and Fertility*, 31, 187-195.
- Parry-Weeks LC, Holtan DW (1987). Effect of Altrenogest on pregnancy maintenance in unsynchronized equine embryo recipients. *J Reprod Fertil Suppl*, 35, 433-438.
- Pool KF, Wilson JM, Webb GW, Kraemer DC, Potter GD, Evans JW (1987). Exogenous hormone regimens to utilize successfully mares in dioestrus (days 2-14 after ovulation) as embryo transfer recipients. *J Reprod Fertil Suppl*, 35, 429-432.
- Squires EL, McKinnon AO, Carnevale EM, Morris R, Nett TM (1987). Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. *J Reprod Fertil Suppl*, 35, 399-403.
- Squires EL (1993). Embryo Transfer. In: McKinnon AO, Voss JL, Ed. *Equine Reproduction*, Williams & Wilkins, 357-367.
- Squires EL, McCue PM, Vanderwall D (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51, 91-104.
- Squires EL, McCue PM, Niswender KD, Alvarenga M (2003). A review on the use of eFSH to enhance reproduction performance, *49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, New Orleans, Louisiana.
- Taveiros AW, Oliveira MA, Lima PF, Tenreiro Filho F, Bartolomeu CC, Santos MH, Oliveira LR, Iunes-Souza TC, Freitas JC (2003). Ultrasonographic monitoring of 103 recipient mares of different reproductive status during the first 30 days after embryo transfers. *Vet Rec*, Nov 1; 153(18): 558-560.
- Wilsher S, Allen WR (2000). The influences of maternal size, age and parity on placental and fetal development in the horse. *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*, Saari, Finland, 74-75.