

Aspetti tecnico pratici dell'Embryo Transfer

Practical Features of the Embryo Transfer



Dr. Denis Necchi

Medico Veterinario, Dipl. ECAR
Select Breeders Services Italia, Cremona - denis@sbsitaliasrl.com

L'Embryo Transfer o Trasferimento Embrionale nella nostra lingua è una tecnica di riproduzione assistita che riscuote un grande interesse sia nell'ambito scientifico che in quello allevatorio. L'impiego della tecnica ha avuto sicuramente una crescita ed uno sviluppo molto importante nell'ultimo decennio, sia perché, tutto sommato, di semplice attuazione e sia perché col tempo gli allevatori ne hanno appreso i vantaggi. La prima gravidanza ottenuta da Trasferimento Embrionale nella cavalla risale al 1974.

I progressi legati alla gestione delle cavalle prima, durante e dopo il trapianto embrionale hanno consentito nel tempo un affinamento della tecnica, tale da consentirle di avere un importante valore commerciale aggiunto. Facciamo un piccolo esempio. E' sempre più comune il fatto di avere cavalle impegnate agonisticamente per tutta la stagione di monta ed il più delle volte questi eventi non coincidono con i normali programmi di accoppiamento, ostacolando le probabilità di procreare. Con l'utilizzo dell'Embryo Transfer la fattrice può essere inseminata e quindi sottoposta a lavaggio uterino per la ricerca dell'embrione solo con una breve interruzione del programma di lavoro. Tecnicamente, l'attuazione del trapianto embrionale prevede l'utilizzo di una cavalla propriamente definita "donatrice", dalla quale saranno prelevati uno o più embrioni e di una o più cavalle, definite "riceventi", che riceveranno appunto gli embrioni da trasferire. In pratica e' possibile inseminare una fattrice, avere una gravidanza ma ottenere un puledro utilizzando come "incubatore" l'utero della cavalla ricevente che, se tutto procede nel migliore dei modi, porterà a termine la gravidanza. La "neo-gestante" o "la madre non-biologica" partorerà quindi un puledro con un patrimonio genetico totalmente differente dal suo.

Il Trasferimento Embrionale è una tecnica di riproduzione assistita che prevede la manipolazione di embrioni, zigoti ottenuti dalla fecondazione del-

Embryo transfer is probably the most used assisted reproductive technology in the equine species. The development of this reproductive technique has been rising in the last 10-15 years. Embryo transfer is a relatively simple technique to apply, giving breeders an easy understanding for the applied advantages.

The First Embryo Transfer successfully performed was accomplished in 1974.

As of date the procedure has become evolved, due to the management of the mares before, during and after the embryo transfer. In a range set where higher use of this procedure is now being performed, science and technology have allowed for a higher achievement to perfect the embryo transfer technique, giving it a higher use and credit in the breeding industry. For example, it is very common to have mares in full competition for the majority of the year and this fact does not allow the mare to produce offspring while they are eventing.

By applying E.T. technique a performing mare can be inseminated and flushed having little or no interruption during competition.

Applying the embryo transfer has two parts. The Donor Mare is applying the embryos for harvest and the recipient mare is applying itself to receive the embryos for pregnancy. Which concludes, receiving a viable embryo from donor mare, allowing for transfer to recipient mare for incubation in uterus during all gestations of pregnancy till foaling. The non-biological mother will not share the same DNA format as the foal.

la cellula uovo da parte dello spermatozoo. Questa specificazione è abbastanza importante poiché molte persone pensano che si lavori con ovuli e cioè con i singoli gameti femminili. Le tecniche che prevedono la manipolazione delle cellule uovo femminili sono infatti ben distinguibili dall'Embryo Transfer, sia per definizione (es. Oocyte Transfer, Ovum Pick Up) che per le tecniche impiegate.

Passiamo ora ad analizzare in modo abbastanza semplice ma dettagliato come si esegue l'Embryo Transfer.

Dopo un attento monitoraggio del calore della donatrice e della ricevente, la prima viene "coperta" naturalmente od inseminata artificialmente con seme congelato, fresco o refrigerato. E' importante conoscere a priori la fertilità dello stallone ed utilizzare preferibilmente il seme di stalloni di comprovata fertilità.

Per sperare di ottenere buoni risultati e' inoltre essenziale che la cavalla donatrice e la sua ricevente abbiano gli stadi del ciclo sincronizzati. La cavalla ricevente dovrà ovulare in un periodo compreso fra un giorno prima e tre giorni dopo l'ovulazione della donatrice.

Nonostante esista la possibilità di sincronizzare od indurre farmacologicamente le ovulazioni, e' abbastanza frequente trovarsi di fronte a cavalle che ovulano al di fuori degli schemi. Per questo motivo sarebbe opportuno avere a disposizione almeno due o tre riceventi per donatrice; in questo modo si semplifica il lavoro veterinario, si evitano al proprietario della donatrice perdite economiche dovute alla perdita di cicli per mancata sincronizzazione ed in alcuni casi per la mancata presenza alla competizione.

Torniamo ora all'esecuzione tecnica dell'Embryo Transfer. Una volta che la donatrice e' stata inseminata e che l'ovulazione è stata accertata, si procede al recupero dell'embrione tramite lavaggio uterino o "flushing" per gli autori anglofoni. Il lavaggio uterino

Embryo transfer is a reproductive assisted technique based on the manipulation of embryos obtained by the fertilization of the oocyte from the sperm cell.

This explanation is very important because very often breeders believe that embryo transfer is performed by transferring oocytes and not embryos. The technique involving oocyte manipulation is completely distinct from the embryo transfer itself (Oocyte transfer, Ovum Pick-Up).

When estrus cycle management assessment of the donor and recipient mare has been established, the donor mare will be inseminated with frozen, cooled or fresh semen.

Prior to insemination it is very important to choose a stallion known for good fertility. To obtain good results donor and recipient mare must have their cycles synchronized. Recipient mare should ovulate one day prior to three days after ovulation of donor mare.

However there is a possibility that when trying to synchronize or induce the ovulation of any mare, nature will prevail with no results rendering. This is why the concept of using two or three recipient mare to one donor mare is applied, giving better chances to match a cycle faster to your donor mare, resulting in less money and time spent on embryo transfer procedure for veterinarian and owner.

Once the donor mare has been inseminated and ovulation detected, the donor mare uterus will be flushed for embryo recovery. Uterine flushing usually is

viene effettuato circa 7-8 giorni dopo l'ovulazione, eseguendo ripetuti lavaggi dell'utero (solitamente in numero di 3 o 4) con soluzioni appositamente preparate. (Fig. 1)

Per l'esecuzione si introduce all'interno dell'utero della cavalla, in modo totalmente a-traumatico, un catetere la cui estremità termina con un palloncino che viene insufflato con circa 80 ml di aria. Lo scopo del palloncino è quello di chiudere l'apertura cervicale ed impedire l'eventuale reflusso di liquido in vagina. (Fig. 2.)

La soluzione di lavaggio viene introdotta nell'utero attraverso il catetere, fino ad ottenere un discreto riempimento della cavità uterina. Il passaggio suc-

performed 7-8 days following ovulation. The flushing procedure is performed usually with 2-3 uterine lavages with appropriate solutions (Fig. 1) During the flushing of the donor mare's uterus, a catheter combined with an air inflation tip consisting of a balloon ending is inserted through the cervix penetrating into the uterus. The purpose of the balloon is to close the cervical opening to avoid solution fluid reflux into the vagina (Fig 2.).

The flushing solution is placed into the uterus through the catheter till the ute-

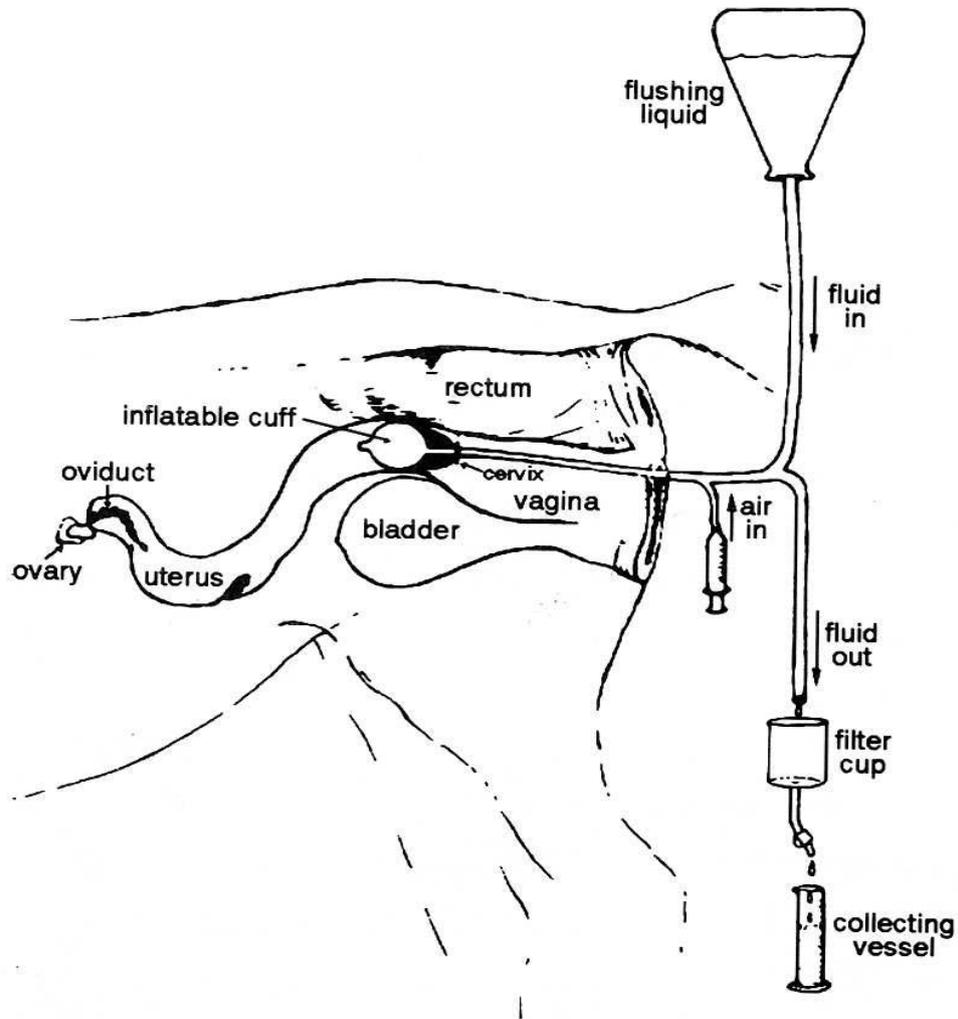


Fig. 1: rappresentazione schematica del posizionamento del catetere e della modalità di esecuzione del lavaggio uterino. Picture showing the catheter inside the uterus and uterine flushing.



Fig 2. Nella figura sono rappresentati 4 diversi tipi di catetere. Il palloncino all'estremità è insufflato per una migliore identificazione. Picture showing for different catheter. The balloon on the tip are inflated for a better representation.

cessivo consiste nel recuperare, utilizzando sempre la stessa sonda, la soluzione precedentemente introdotta nell'utero.

Un'altra sacca di soluzione viene a questo punto introdotta e recuperata, si procede con questi lavaggi per circa tre o quattro volte. Ogni volta la soluzione recuperata viene fatta passare attraverso un piccolo filtro che trattiene una minima parte di liquido e tutte le particelle che hanno dimensioni simili a quelle di un embrione.

Una volta terminati i lavaggi uterini si passa alla fase successiva, che consiste nella ricerca dell'embrione. Il filtro utilizzato precedentemente viene aperto e quindi posto sotto ad un microscopio. A questo punto ha inizio la ricerca vera e propria dell'embrione che se avrà un esito positivo, permetterà di visualizzare l'embrione come una sfera del diametro variabile di circa 1 millimetro (Fig.3).

A questo punto se la ricerca ha dato gli esiti sperati si prospettano due opzioni: la prima consiste nel trasferire non-chirurgicamente l'embrione nell'utero della ricevente utilizzando uno strumento molto simile a quello usata per l'inseminazione artificiale dei bovini; la seconda opzione e' quella

rine cavity is totally filled to maximum capacity. After few seconds the fluid is then recovered by means of the same catheter. Continuing, an extra bag of solution is used to flush the uterus and than recovered. This procedure must to be repeated for 3 or 4 times. Each time the solution recovered from the uterus is filtered through a filter that keeps some fluid, the embryo and all the particles similar in size.

When uterine flushing is over the embryo search is taking place. The same filter as above is opened and the bottom of the filter is analyzed under a stereomicroscope. The embryo, if present, will be visualized as a sphere with a diameter of about one millimeter (Fig.3)

If the embryo is recovered from the donor mare there are two options. The first is to immediately transfer the embryo into the recipient by means of an instrument quite similar to the one used to artificially inseminate cows. The second option is

di spedire ad un centro che dispone di più riceventi l'embrione opportunamente confezionato in un contenitore apposito. Ovviamente, anche in questo caso, la donatrice e la ricevente sono state opportunamente sincronizzate anche se a distanza. La necessità di spedire l'embrione deriva dal fatto che donatrice e ricevente devono avere, come detto in precedenza, le ovulazioni sincronizzate e più i giorni di a-sincronia aumentano minori saranno le percentuali di successo.

Inoltre, visto il numero di riceventi necessarie, molti proprietari di donatrici preferiscono affittare la ricevente da centri di riproduzione equina che,

to ship the properly packaged embryo in a reproduction centre where a recipient herd is kept. Also in this case the recipient must to be synchronized with the donor mare. This option is important because donor and recipient mares must to be perfectly synchronized and the more they are asynchronous the less are the chances to obtain a pregnancy.

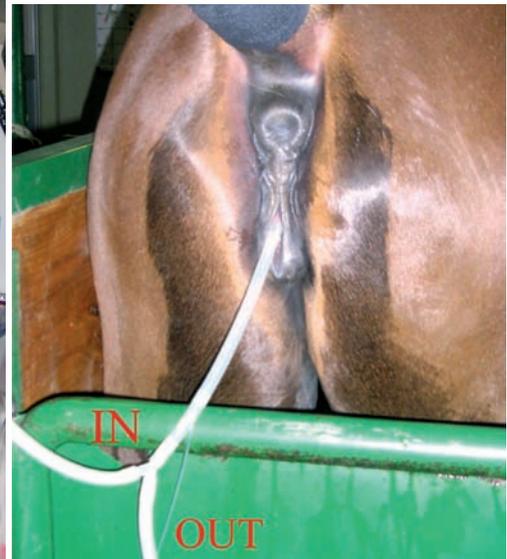
Another good reason for shipping embryos to a recipient herd facility is because most of donor mare owners prefer to rent a recipient from reproduction



Stereomicroscopio con filtro durante la fase di ricerca dell'embrione. Stereomicroscope and filter during the embryo search



Fig 3. Immagine al microscopio di un embrione equino di circa 7 giorni (blastocisti precoce) - Picture showing 7 days equine embryo (early blastocist)



Catetere propriamente posizionato durante la fase di lavaggio dell'utero. Nel dettaglio la via di ingresso della soluzione di lavaggio e la via di uscita che costringerà la soluzione a passare attraverso il filtro. Flushing catheter inside the mare during the flushing. In the picture the way in and the way out are represented. The way out is going to the filter.

come il nostro, offrono un parco riceventi dal quale è possibile usufruire della ricevente più propriamente sincronizzata.

Una volta che l'embrione spedito raggiunge il centro, viene lavorato e trasferito con le stesse modalità di un embrione fresco. In ogni caso, una volta che l'embrione è stato trasferito all'interno dell'utero della cavalla ricevente, bisogna attendere 7-8 giorni per verificare se ha attecchito dando origine alla gravidanza; il trasferimento è stato infatti eseguito trapiantando un embrione di circa 7-8 giorni, sarà quindi possibile sapere l'esito del trapianto 14-15 giorni dopo l'ovulazione della donatrice.

Negli ultimi anni è stata introdotta un'alternativa al trapianto dell'embrione fresco. I ricercatori hanno sviluppato un modo per migliorare le percentuali di gravidanza ottenute dopo il trapianto di embrioni congelati. Questa tecnica denominata "vitrificazione" apporta tutti i vantaggi del congelamento provocando meno danni durante le fasi di congelamento, che in questo caso sono fasi di vitrificazione.

L'applicazione prevede però l'utilizzo di embrioni di dimensioni molto ridotte; in termini pratici il lavaggio per la ricerca dell'embrione viene anticipato a circa 6-6,5 giorni post-ovulazione (embrione più giovane corrisponde a dimensioni ridotte).

Dopo questa breve parentesi torniamo ora a parlare del trasferimento dell'embrione di 7-8 giorni.

Per quanto riguarda i risultati ottenibili, in linea di massima, possiamo affermare che le probabilità di recupero dell'embrione variano da un 50% ad un 80% a seconda della fertilità della donatrice e dello stallone.

È molto importante ricordare che nella donatrice dovrà comunque instaurarsi una gravidanza, la quale verrà temporaneamente interrotta con il lavaggio dell'utero e successivamente ripristinata con il trasferimento nell'utero della ricevente.

Dopo il trasferimento dell'embrione, le probabilità che si instauri una gravidanza sono intorno al 70%.

Esistono purtroppo dei fattori fisiologici che limitano in parte l'Embryo Transfer equino, cosa che invece si osserva in modo molto più ridotto nel bovino.

Il primo è dovuto al fatto che tutt'oggi è molto difficile e molto costoso indurre una superovulazione nella cavalla; cosa che si tradurrebbe in un maggior

numero di riceventi, come il nostro, che può selezionare il miglior centro ricevente per ogni donatore. Il secondo è dovuto al fatto che, a differenza del bovino, la cavalla ricevente deve essere sincronizzata con l'ovulazione della donatrice. Una volta che l'embrione è stato trasferito, il tecnico può trasferire l'embrione nella ricevente mare con la stessa tecnica utilizzata per i freschi embrioni.

La scansione ultrasonica per la diagnosi di gravidanza può essere eseguita 7-8 giorni dopo il trasferimento: l'età dell'embrione al momento del trasferimento è di 7-8 giorni e quindi dopo 14-15 giorni dall'ovulazione della donatrice è possibile sapere se una gravidanza è stata stabilita nella ricevente mare.

In questi ultimi anni una nuova procedura ha permesso di migliorare il tasso di gravidanza dopo il trasferimento di embrioni congelati. Questa tecnica, nota come "vitrificazione", conserva tutti i vantaggi del congelamento ma i danni cellulari prodotti sono molto minori. Gli embrioni per la vitrificazione sono solitamente raccolti prima: 6 - 6,5 giorni dopo l'ovulazione della donatrice. A questo tempo l'embrione è più piccolo e quindi subisce meno danni durante il processo di vitrificazione.

Il tasso di recupero per l'E.T. eseguito 7-8 giorni post-ovulazione varia dal 50% al 80% a seconda della fertilità della donatrice e dello stallone utilizzato per l'inseminazione.

Il tasso di gravidanza complessivo dopo il trasferimento è considerato intorno al 70%. Ci sono due peculiarità fisiologiche nella mare che limitano l'Embryo Transfer equino. La prima è che, a differenza del bovino, è quasi impossibile indurre la superovulazione nella mare. La superovulazione è la produzione di un alto numero di follicoli e quindi di un alto numero di ovociti, il che significa un aumento del numero di fecondazioni che possono verificarsi durante lo stesso ciclo.

La seconda è la variazione in lunghezza

numero di ovuli prodotti, un maggior numero di ovuli fecondati e di conseguenza più embrioni trasferibili all'interno dello stesso ciclo della donatrice.

Il secondo limite fisiologico è dovuto alla differenza nella durata del ciclo estrale della cavalla. La variabilità che esiste tra due cicli della stessa fattrice o tra le diverse fattrici complica notevolmente i processi di sincronizzazione tra donatrice e ricevente.

Dopo questa chiacchierata introduttiva vediamo di capire quali sono i principali vantaggi e svantaggi derivanti dall'applicazione dell'Embryo Transfer.

Visto che nell'attuazione classica dell' E.T. l'embrione viene prelevato dalla madre vera (genetica) 7-8 gg dopo l'ovulazione per essere trasferito in una ricevente, la fattrice dalla quale l'allevatore desidera ottenere un prodotto viene praticamente alleviata del peso della gravidanza.

Viene da pensare che a trarne vantaggio sono ad esempio le cavalle da show che, se gravide, non potrebbero partecipare alle competizioni per buona parte della gestazione, per tutto il periodo dell'allattamento fino allo svezzamento del puledro. Inoltre le donatrici, che nella maggior parte dei casi sono fattrici di notevole importanza, vengono esonerate dai rischi legati al parto. Vantaggio sicuramente non trascurabile.

Recenti studi hanno dimostrato inoltre la possibilità di ottenere con l'E.T. (Embryo Transfer) puledri anche da cavalle di due anni di età, addirittura prima che entrino a far parte del circuito competitivo. Anche se in questa categoria di cavalle le percentuali di recupero dell'embrione sono piuttosto basse, l'alternativa sarebbe un 20% di probabilità di portare a termine la gravidanza. Candidate ottimali per l'Embryo Transfer sono anche le fattrici con una scarsa fertilità o le cavalle problematiche come quelle anziane. Anche le fattrici con lesioni del tratto genitale dovute a traumi durante il parto, oppure quelle che per più di una volta hanno perso la gravidanza sono delle ottime candidate al trasferimento embrionale. In generale, possono rientrare in un programma di trasferimento embrionale, tutte le fattrici che per motivi o di natura agonistica o di natura fisiologica e anatomica, non possono o non riescono a mantenere e portare a termine una gravidanza.

L'Embryo Transfer riscontra un discreto successo

of the mare's estrus cycle that is inconsistent between cycles displayed by the same mare as well as between individuals and makes difficult the synchronization of donor and recipient mare.

After having described the E.T. procedures it is now time to list advantages and disadvantages of this technique. The embryo is collected from the donor mare 7-8 days after ovulation allowing her not to carry an eventual pregnancy. This can be a big advantage can be important for a performing mares, in fact if she was pregnant could obviously not participate to sport events for a long period. Donors are usually highly valuable mares and by using this technique owners avoid the risks due to parturition. Moreover, it has been recently shown that there is an opportunity to obtain embryos from 2-3 year old mares. The recovery rate in these mares are lower than in older mares, but are 20% higher than the foaling rate expected at this age.

Embryo transfer can give extra chances to produce offspring from problem subfertile or aged mares. Good candidates for Embryo Transfer are also mares with problems to the reproductive tract, mares that for more than one time has lost the pregnancy and late foaling mares. If these mares are bred too late in the season, their next offspring will be foaled again very late. The better thing to do in these cases is to inseminate the mare, flush the uterus and transfer the embryo into a recipient mare. The recipient will foal late anyway, but the following year the donor mare will be ready to be early inseminated in the season, hoping for a birth at the beginning of the subsequent breeding season.

Another advantage is that the number of the offspring obtained by a single mare can be increased within the same breeding season.

anche nel caso di fattrici che partoriscono tardi nella stagione. Visto che inseminarle e farle partorire porterebbe alla nascita di un altro puledro alla fine della stagione successiva, è preferibile inseminarle e trasferire l'embrione.

In questo modo si avrà comunque un puledro "tardivo" partorito dalla ricevente, ma la donatrice sarà disponibile subito all'inizio della stagione. Il puledro che nascerà l'anno dopo verrà alla luce nei primi mesi dell'anno. Altro vantaggio, più di natura commerciale, è quello di poter ottenere più puledri nella stessa stagione. Il numero di puledri registrabili è molto variabile, esistono certi libri genealogici di razza che non pongono un limite (es. Quarter Horses) ed altri che ad esempio consentono due puledri per donatrice, una gravidanza della ricevente ed una della madre.

Prima di decidere di utilizzare le fattrici come donatrici è sempre meglio informarsi presso i registri di appartenenza, sia perché ci possono essere dei moduli da compilare prima e sia perché i regolamenti possono cambiare.

Prima di passare ad eventuali svantaggi è bene ricordare che tutte le fasi dell'Embryo Transfer sono assolutamente a-traumatiche per le cavalle e vengono eseguite perlopiù senza somministrare sedativi.

Ora, più che di svantaggi dovremmo parlare di limitazioni. La prima, come già accennato in precedenza, potrebbe essere sicuramente data dalla mancata possibilità di avere in Europa farmaci che possano far superovulare le cavalle in modo da poter ottenere più embrioni per ciclo. In natura le cavalle ovulano solitamente uno, due o in casi eccezionali tre oociti per calore.

Di conseguenza, anche la percentuale di embrioni recuperati e trasferiti per ciclo sarà inferiore a quella che si osserva nei bovini dove con la superovulazione si arrivano a produrre anche 10-15 embrioni per ciclo.

Altro fattore limitante è la necessità di sincronizzare almeno due o tre riceventi per donatrice. Questo significa che se un proprietario di due cavalle decide di fare l'Embryo Transfer dovrà disporre di almeno 2 o 3 cavalle riceventi.

Il rapporto uno a uno e cioè una donatrice ed una ricevente non è che non possa funzionare, è che

The number of foals than can be produced yearly is different between stud-books, some do not pose any limitation on the number of offspring produced per season (i.e. Quarter Horses and Paint Horses); on the contrary other horse registries allow to obtain two pregnancies from the donor, but only the first must to be carried by a recipient mare.

Before go through the disadvantages of this technique it is important to recall that all the Embryo Transfer procedures are extremely safe for the mares and most of the times sedation is not required.

Instead of disadvantages we prefer to consider them only limitations. The first of which is considered, as described above, the impossibility to have in Europe the drug to induce the super ovulation in the mare. Physiologically mares usually ovulate one, two or in very few cases three embryos per cycle. The number of recovered and transferred embryo is very low compared to super ovulated cows where the number can be 10-15 embryos collected and transferred each cycle.

Each donor requires two or three recipient synchronized. The owner should provide this number of recipient, with an increase in costs. The ratio 1:1 or one donor one recipient could work; the problem is that for the donor mare owner there is a risk to waste time and money due to the fact that the mares are not well synchronized. Several factors are involved in the success of the Embryo Transfer procedure: technician skills, donor age and fertility, quality of semen used and of the recipient mare are the main factors involved. Very important for the success of this technique is also the embryo quality and in fact not all the embryos collected are perfect. Aged or problem mares can produce embryos of

aumentano molto i rischi di perdere dei calori perché le cavalle non sono propriamente sincronizzate. Dato che i costi da sostenere per l'E.T. da parte del proprietario sono piuttosto consistenti, perdere dei calori si traduce in perdite di denaro.

In conclusione possiamo dire che i risultati ottenibili con il Trasferimento Embrionale dipendono ovviamente da molti fattori. L'età della donatrice, la sua fertilità, la qualità del materiale seminale e quella della ricevente come pure l'esperienza del veterinario, sono i principali fattori che entrano in gioco. Non ci si deve dimenticare della qualità dell'embrione trapiantato visto che purtroppo non tutti gli embrioni sono perfetti. Cavalle anziane o con problemi di fertilità possono infatti produrre embrioni di scarsa qualità tali da diminuire le percentuali di attecchimento.

Se tutte queste variabili sono favorevoli e' indicativo aspettarsi una gravidanza ogni due tentativi effettuati. Se invece, ad esempio, il seme utilizzato e' di qualità scadente, la donatrice e' anziana oppure le riceventi non sono adeguatamente selezionate e' ovvio che i risultati possono calare drasticamente.

Il Trasferimento Embrionale rimane una tecnica di riproduzione assistita in grado di offrire innumerevoli vantaggi ma se applicata in modo errato le aspettative saranno disattese.

low quality that can decrease the chances of obtaining a pregnancy.

Usually having a recipient in foal every two attempts is a good compromise for Embryo Transfer. If semen used is of bad quality, donor mare is sub-fertile and recipient mares are not properly synchronized the outcome of this technique can be very disappointing.

Embryo Transfer when used in the mare can offer considerable advantages for the horse breeding industry; nevertheless, if not properly performed can lead to disappointing results



Ricevente avelignese con puledro Quarter Horse - Haflinger recipient with a Quarter Horse foal on her side