

Kısıraklarda İntrafallopian Gamet Transferi

*Mehmet Can GÜNDÜZ**

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

**Sorumlu Yazar: İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı,
Avcılar, 34320, İstanbul.
e-posta: mcg@istanbul.edu.tr, Tel: 0212 4737070-17324*

Geliş Tarihi / Received : 25.03.2010

ÖZET

Kısıraklarda oosit eldesi ve transferi teknikleri son yıllarda oldukça ilerlemiştir. Bu ilerlemeyle birlikte yeni araştırma ve klinik uygulama olanakları da ortaya çıkmıştır. Ovidukt, uterus ve serviks problemleri yüzünden gebe kalmayan ya da gebeliklerini devam ettiremeyen kısırakların oosit transferiyle fertiliteleri devam ettirilebilmektedir. Oositler genellikle ovulasyona yakın folliküllerden transvaginal ultrason rehberliğinde toplandıktan sonra ya direkt alıcı kısrağın oviduktuna transfer edilir ya da kısa bir süre kültür ortamında bırakılır. Alıcı kısırakların fertilizasyonu ya doğal aşım ya da intrauterin suni tohumlamayla sağlanır. Sınırlı sayıda sperm olduğu durumlarda ise oosit ve sperm birlikte ovidukta transfer edilir.

Anahtar Kelimeler: Gamet transferi, oosit, IVF, kısrağ

ABSTRACT

GAMETE INTRAFALLOPIAN TRANSFER (GIFT) IN MARES

Methods for the collection and transfer of equine oocytes have been developed, and uses of these techniques have resulted in new clinical and research possibilities. Because oocyte transfer avoids reproductive problems associated with the oviduct, uterus, and cervix, pregnancies can be produced from many mares that can not carry a pregnancy or produce embryos. Oocytes for clinical transfers are usually collected from preovulatory follicles by using transvaginal ultrason-guided follicular aspiration and cultured for a short interval or transferred directly into a recipient's oviduct. For oocyte transfer, the recipient is inseminated within the uterus or served naturally. Sperm and oocyte are transferred into the oviduct where sperm numbers are limited.

Key Words: Gamete transfer, oocyte, IVF, mare

Giriş

Kısıraklarda ilk başarılı embriyo transferi 1972 yılında yapılmıştır (Allen ve Rowson, 1972). Bu yıldan itibaren embriyo transferi atçılık endüstrisinde önemli bir yer teşkil etmiştir. Embriyo transferi en çok gebeliklerini devam ettiremeyen kısıraklarda

kullanılmaktadır. Fakat reproduktif problemi olan kısıraklardan embriyo eldesinin başarısı son derece düşüktür. Bu tür kısırakların yavrularını alabilmek için onların canlı iken; oositlerini toplayarak Gamete İntrafallopian Transfer (GIFT), İn vitro Fertilizasyon (IVF) ve İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

gibi yardımcı üreme yöntemleri kullanılmaktadır (**Carnevale, 1996**).

İnsan ve diğer memeli türlerinde IVF rutin olarak uygulanmasına rağmen kısıraklarda başarısının düşük olmasından dolayı henüz pratiğe aktarılamamıştır (**Squires ve ark., 2003**). Bilimsel araştırmaların çoğu mezhiba materyalinden elde edilen oositler ile yapılmaktadır. Bu da genetik ilerlemeye engel olmaktadır (**Carnevale, 2004; Squires ve Cook, 1998**).

Beşeri hekimlikte 1980'lerde laparoskopik yolla başlayan oosit eldesi ilerleyen yıllarda yerini Transvaginal Oosit Aspirasyonuna (TVA) bırakmıştır (**Squires ve Cook, 1998**). 1980'lerin sonlarında ise TVA tekniği ineklere adapte edilmiştir (**Pieterse ve ark., 1988**).

Kısıraklarda ilk denemeler ayakta lokal anestezi altında laparotomi tekniği ile yapılmıştır. Bu yöntemle 23 kısırakta, 3 sezonda 72 deneme yapılmıştır (**Vogelsang ve ark., 1988**). Daha sonraki dönemlerde ise kolpotomi tekniği denenmiş ve bu yöntemde ovaryum vaginadan yapılan ensizyonla direkt elle tutularak aspirasyonlar yapılmıştır. Kolpotomi tekniğinde oosit eldesi % 70 oranında iken laparotomi yönteminde % 29 oranında bulunmuştur (**Hinrichs ve ark., 1990**).

Ultrason rehberliğinde TVA tekniği ineklerde kullanılmaya başlandıktan kısa bir süre sonra kısıraklarda da uygulanmıştır. Kısıraklarda TVA ile ilk oosit aspirasyonu 1992 yılında Bruck ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. **Cook ve ark. (1993)**, ultrason rehberliğinde TVA'ya 3 farklı yaklaşım getirmişlerdir: 1) östrustaki invivo olgunlaşmış follükülerin aspirasyonu 2) diöstrustaki olgunlaşmamış follükülerin aspirasyonu 3) at hipofiz hormonu ile uyarılmış ovulasyon öncesi follükülerin aspirasyonu.

Ultrason rehberliğinde TVA'un başarısını etkileyen faktörler arasında aspirasyon iğnelerinin kalınlığı, tek yada çift lümenli oluşu, oositin invivo olgunlaşma durumu, hormonal uygulama, ırk ve kısırağın reproduktif durumu yer almaktadır (**Squires ve Cook, 1996**). Ultrason rehberliğinde TVA

tekniği ile diöstrusta oosit eldesi folikül 15 mm'den küçük olduğunda % 19 oranında iken östrusta çift lümenli iğne kullanıldığında % 84 oranında bulunmuştur (**Cook ve ark., 1993**). **Bracher ve ark. (1993)**, yaptıkları çalışmada tek lümenli 1 mm çaplı iğne kullanımlarında oosit eldesi oranı % 12 iken, çift lümenli 1 mm çapında iğne kullandıklarında oosit eldesi oranını % 24 olarak bulmuşlardır. **Carnevale ve Ginther (1993)** ise 16 g'lik iğne kullandıklarında oosit eldesini % 78 olarak bulmuşlardır.

TVA işlemi ile 130 günlük gebe kısıraklarda, 25 mm follükül olduğunda 12 g lik tek lümenli iğne ile yapıldığında % 50 oranında oosit elde edilmiştir (**Meintjes ve ark., 1995**). Kısırak oositlerinin invitro olgunlaştırılmasında kullanılan medyumlar, hormonlar, makromoleküller ve somatik hücrelerle yapılan çalışmalar sınırlıdır (**Squires, 1996**). TCM 199 ve Ham's F10 medyumlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, 36 saat sonrasında TCM 199 medyumunun olgunlaştırma oranının Ham's F10'a göre daha iyi olduğu, 48 saat sonrasında ise her ikisinin de eşit olgunlaştırma oranına sahip olduğu bulunmuştur (**Choi ve ark., 2001**).

İn vitro fertilizasyon işlemi insanda, koyunda, inekte ve domuzda uzun süredir başarıyla uygulanmaktadır. Atlarda yapılan in vitro fertilizasyon çalışmaları oldukça sınırlıdır ve başarı oranları da düşüktür (**Squires, 1996**). Atlarda in vitro fertilizasyonun başarısının sınırlı olmasının sebepleri arasında; in vitro olgunlaştırılan oositlerin hücrel ihtiyaçlarının in vivo dan farklı olması ve zona pellusidanın olgunlaştırma esnasında sertleşerek spermilerin içeri girişini kısıtlaması sayılabilir (**Bezard ve ark., 1989**).

Transvaginal Aspirasyon (TVA) işlemi en çok ovulasyon problemi olan, oviduktal patolojisi ve uterus patolojisi olan kısıraklarda kullanılmaktadır. Kısıraklarda genel olarak 2 tip ovulasyon problemi vardır. Bunlardan ilki hemorajik follükül olarak adlandırılır. Hemorajik follüküller özellikle yaşlı kısıraklarda ve sonbaharda görülür. Hemorajik follüküller 70 mm ve daha yukarı çapa ulaşır

ve ovulasyon gerçekleşmez. Diğer bir problem ise kistik folliküllerdir. Bu da daha çok yaşlı kısıraklarda görülür ve follikül çapı çok fazla artmazken follikülün duvarı kalınlaşır ve şekli düzensizleşir (**Carnevale, 1996**).

Gelişen embriyo uterusu gelmeden önce oviduktta 5-6 gün kalır. Gametlerin yaşaması, taşınması, fertilizasyonu, ve embriyonun gelişimi için oviduktun uygun ortama sahip olması gerekir. Kısıraklarda ovidukt patolojileri arasında ovidukt lumeninin tıkanıklığı ve oviduktta yangı yer alır. Bu da spermatazoa ve embriyonun geçisine ve yaşamasına engel olur (**Carnevale, 1996**).

Kısıraklarda fertilitate problemlerinin başında uterus problemleri yer alır. Bunlar arasında yangısal olayların artması ve uterusu sıvı birikmesi en önemli problemlerdir (**Carnevale, 1996**). Spermatozoa uterusu toplanan sıvıya bırakıldığında motilitelerinin hızla azaldığı gözlenmiştir (Squires ve ark., 1989).

Işık ve elektron mikroskopu ile yapılan çalışmalarda yaşlı kısıraklardan elde edilen oositlerin genç kısıraklardan elde edilen oositlere göre daha fazla morfolojik anomalilere sahip olduğu gözlenmiştir. Oosit vericisi olarak yaşlı kısıraklar kullanıldığında gebelik elde etmek için daha fazla sayıda transfer yapmak gerekmektedir (**Carnevale ve ark., 1999**).

Yaşlı kısıraklarla genç kısıraklar karşılaştırıldığında ovulasyonlar arasının yaşlı kısıraklarda daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca follikül gelişiminin yaşlı kısıraklarda daha yavaş olduğu bulunmuştur (**Carnevale ve Ginther, 1993a**). Yaşlı kısıraklarda yapılan başka bir çalışmada ise embriyonik veziküllerin çaplarının genç kısıraklara oranla daha küçük olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda yaşa bağlı oosit defektlerinin yaşlı kısırakların infertilitelelerinde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Fakat yaşlı kısıraklardaki oosit defektlerinin sebepleri üzerine olan bilgiler sınırlı düzeydedir (**Carnevale ve ark., 1993**).

Kısıraklarda in vitro maturasyon sürecinde kültür medyumuna LH, FSH ve estradiol ilaveleri yapılmıştır. Yapılan bu ilavelerin

oositlerin maturasyonlarına büyük derecede yardımcı olduğu gözlenmiştir (**Bezard ve Palmer, 1992**).

Verici ve alıcı kısırakların seçimi

Kısıraklarda oosit transferinin başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri verici kısırakların yaşıdır. Yaşlı kısıraklardan (20-26 yaş arası) alınan oositler genç kısıraklara (3-7 yaş arası) transfer edildiğinde gebelik oranı % 31 olarak bulunmuştur. Genç kısıraklardan (6-10 yaş arası) alınan oositler genç kısıraklara (3-7 yaş arası) transfer edildiğinde ise gebelik oranı % 92 olarak bulunmuştur (**Carnevale ve Ginther, 1995**).

Embriyo transferinden sonra gebelik elde edilmeyen kısıraklar potansiyel oosit vericileridir. Oosit vericileri için gerekli şartlar çok fazla değildir. Verici olabilecek hayvanın uterusu potansiyel patojenlerden temizlenmiş olmalıdır. Ayrıca folikül aspirasyonu yapıldıktan sonra kısırağın siklusu prostaglandin enjeksiyonu ile kısaltılmalıdır (**Carnevale, 1996; Squires ve Cook, 1996**).

Alıcı kısıraklar spermaların ve embriyonun yaşayabilmesi için optimal şartlara sahip olmalıdır. Bunun için genital organlarında herhangi bir anatomik yada patolojik bir anormallik bulunmamalıdır (**McKinnon ve Squires, 1988**). Ayrıca hayvanlarda cerrahi bir transfer olacağından buna uygun hayvanlar olmalıdırlar. Genelde ovaryumu asan ligamentler gevşediğinden ilk doğumu yapmış kısıraklar tercih edilir (**Carnevale, 1996**).

Verici ve alıcı kısırakların senkronizasyonu

En kritik noktalardan biri alıcı ve vericilerin senkronizasyonudur. Genelde oosit transferi kızgınlığın 3. günü ile ovulasyon başlangıcı arasında yani hCG uygulamasından 44-48 saat sonra yapılır (**Carnevale, 2004**). Ayrıca alıcı hayvanlardaki dominant folikül aspire edilmelidir. Çünkü alıcı hayvanın kendi oositleriyle döllenmesi önlenmelidir. Alıcının oositini uzaklaştırılması ya transvaginal aspirasyonla yapılabilir ya da transfer

yapılırken follikül aspire edilebilir (**Carnevale, 1996**).

Kısıraklarda kullanılan en yaygın senkronizasyon metodu yavaş salımlı progesteron içeren vaginal materyallerin kullanılmasıdır. Bu yöntemde PRID gibi progesteron içeren vaginal materyaller 8 gün süreyle vaginada bırakılır. 8. günde PGF2 α enjeksiyonu yapılır ve 4-5 gün sonra kısrağın östrusa gelmesi beklenir.

Oositlerin toplanması

Kısıraklarda oosit toplama işlemi birçok yolla yapılabilir. Bunlardan ilki; kısrağa infiltrasyon anestezisi yapıldıktan sonra flank yaklaşım tekniğiyle laparotomi ile açılıp ovaryumun dışarıya alınması ve folikül sıvısıyla birlikte içindeki oositin aspire edilmesidir. Bu yolun dezavantajı zahmetli olması ve cerrahi yoldan elde ediliyor olmasıdır. Son yıllarda tercih edilen yöntem ya lapraskopik cerrahi ile yada transvaginal ultrason yardımıyla oositlerin aspire edilmesi esasına dayanır. Aspirasyon yapılmadan 20 dakika önce kısrağa 0.45 mg/kg xylazine, 0.05 mg/kg acepromazine, 0.22 mg/kg dozunda butarphanol karışımı sakinleştirici olarak verilir. Perineal bölge antiseptik solüsyonlarla temizlenir. Steril bir kayganlaştırıcı yardımıyla prob kayganlaştırıldıktan sonra vaginaya doğru yönlendirilir. Diğer elle de rektumdan ovaryum yakalanır ve probun ucuna doğru yönlendirilir. Folikül sabitlenip ekranda gözüktüğü zaman probun üzerindeki aspirasyon iğnesi folikülün içine yönlendirilir ve folikül sıvısı aspire edilir. Daha sonra, toplanan sıvı steril bir petri kabına konarak folikül sıvısı içindeki oosit değerlendirilir (**Rantanen ve McKinnon, 1998; Squires ve Cook, 1996**).

Oositlerin değerlendirilmesi

Folikül aspirasyonundan hemen sonra folikül sıvısı steril bir petri kabına koyulmalıdır. Sıcaklık değişimi minimumda olmalıdır. Oosit etrafında kumulus hücreleri ve granuloza hücreleri yer alır. Bu kompleks

çıplak gözle görülebilecek bir yapıdadır (**Carnevale, 1996**).

Olgunlaşmamış bir follikül sıvısı yeşil bir görünüme sahiptir ve ufak bir kan kontaminasyonu olabilir. Granuloza hücreleri sıkı kompakt tabakalar şeklinde gözüktür. Kumulus kompleksi zona pellusida etrafında sıkı bir katman olarak gözüktür. Oosit aspirasyonu hCG uygulamasından 24 saat sonra (yaklaşık ovulasyondan 12 saat önce) yapıldığında zona pellusida etrafında kumulus hücreleri ve bunlara tutunmuş granuloza hücreleri taneler halinde görülür. Olgunlaşma gerçekleşikçe granuloza kompleksi yavaş yavaş oositin uzaklaşmaya başlar (**Carnevale, 1996; Squires, 1996**).

Oosit değerlendirilmesi etrafındaki hücresel kitlelerden dolayı oldukça zordur. Olgun oosit eşit dağılmamış lipid kitlelerinden dolayı heterojen bir görünümde izlenir. Ayrıca aspirasyon sonrasında oosit fragmentli bir yapı gösterir. Zarar görmüş oositler normal görünümde, oval yada kumulus'a doğru uzanan yapılar karanlık bir yapı şeklinde gözükülebilir. Pipetle kumulus hücreleri oositin etrafından çekildiği zaman oositteki zedelenme ortaya çıkar. Follikül sıvısı aspire edildiği zaman zona pellusidada meydana gelen zedelenme daha sonra oositin fragmentlerinde ayrılmalara neden olur. Fragmentleri ayrılmış oositler genelde yaşayamazlar ve GIFT'in başarısını azaltırlar (**Carnevale, 1996**).

Aspire edilen oosit 3 ila 24 saat arasında olgunlaştırma medyumları içinde olgunlaşmaları için bekletilmelidir. Olgunlaştırma işlemi için farklı içerikte çeşitli medyumlar kullanılabilir. Bunların içinde en sık kullanılan medyumlar TCM-199, B2, Ham's F10'dur. Bu medyumların içinde FSH, LH, eCG ve östradiol gibi hormonlar; granuloza ve teka hücreleri gibi somatik hücreler bulunmaktadır. Bu medyumların görevi oosit yaşamını devam ettirmek ve aynı zamanda metafaz II safhasına ulaşmasını sağlamaktır (**Jacobson ve ark.,2010; Squires, 1996**).

Oosit transferi

Oositlerin yaşamını etkileyen en önemli etken onların yapısında defektlerin olup olmamasıdır. Bunların dışında kromozomal anomaliler, endokrin bozukluklar, oosit vericilerinin yaşı, in vitro kültür ortamının uygun olmaması ve başarısız transfer çalışmaları etkenler arasındadır. 15 yaşın üzerindeki vericilerden alınan oositlerin yaşama gücü genç kısırlardan alınan oositlere göre düşüktür (**Coutinho da Silva, 2008; Carnevale, 1996; Ginther, 1992**).

Oositler ovidukta ipsilateral ya da kontralateral olarak transfer edilir. İnsanlarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki ipsilateral transferde başarı oranı daha fazladır (**Ransom ve ark., 1994**). İnsanlarda gebelik şansını artırmak amacıyla multiple oosit transferi yapılırken, kısırlarda ikiz veya çoklu gebelikler kontraendike olduğundan genelde tek bir oosit transferi yapılır (**Nelson ve ark., 1993**). Kısırlarda transfer işlemi cerrahi olarak genel anestezi altında ya da ayakta yapılır.

Operasyondan önce kısırağa yüksek dozda transklizan verilir. Operasyon bölgesi antiseptik şartlarda hazırlanır ve ensizyon yapıldıktan sonra ovaryum yakalanır. Eğer ovaryum dışarı alınmıyorsa lokal anesteziklerle ovaryumu asan bağlar gevşetilir ve ovaryum dışarıya alınır. Oosit 0.5 ml'den az bir kültür medimuyula birlikte keskin bir cam pipet içinde ovuduktun ampulla kısmına enjekte edilir ve transferden sonra ovidukt ve ovaryum dikkatlice yerine yerleştirilir (**Carnevale, 1996**).

Alıcı kısırların tohumlanması

Kısırlarda oositler ovulasyondan sonra yaklaşık 12 saat kadar yaşayabilmektedirler (**Ginther, 1992**). Bu kısa süreden dolayı alıcı kısırlar transferden önce ve transferden hemen sonra tohumlanmalıdır. Tohumlama işlemi 7 saat önce ve transferden bir saat sonra yapılmaktadır. Eğer oositler in vivo olarak olgunlaştırılmışlarsa tohumlama transferden üç ila yarım saat önce yapılmalıdır (**Carnevale, 2004**). En çok tercih edilen yol ya taze

spermayla tohumlama ya da fresh spermayla tohumlamadır. Donmuş spermayla yapılan tohumlamalardaki gebelik oranları taze ya da fresh spermayla yapılan tohumlamalardaki gebelik oranlarına göre düşüktür. Oosit transfer edilirken oosit etrafındaki granuloza hücreleri uzaklaştırılır. Granuloza hücrelerinde progesteron üretildiğinden dolayı alıcılarda progesteron hormonu eksikliği mevcuttur. Bu eksiklik özellikle luteal evrenin 3. ve 5. günlerinde görülür fakat daha sonra tekrar yeterli seviyeye ulaşır (**McKinnon ve ark., 1988**). Carnevale (1996), GIFT uygulamalarında ilk gün 50 mg daha sonraki günlerde 100 mg progesteron hormonu verilmesini önermektedir.

İlk yapılan GIFT çalışmalarında McKinnon ve ark. (1988), 6 oosit toplamış ve bunları tekrar aynı hayvanlara transfer etmiş fakat hiçbir gebelik elde edememişlerdir. McKinnon ve Squires (1988), tarafından yapılan 2. GIFT denemesinde 15 oosit aspire edilmiş ve bunlar farklı alıcılara transfer edilmiştir. GIFT'den 2 gün sonra hayvanların oviduktuları alınmış ve içlerinde embriyolar gözlenmiştir. En başarılı GIFT çalışmaları oosit aspirasyonundan yaklaşık 24 saat önce hCG yapıldığı ve oositlerin 16-20 saat in vitro olgunlaştırma dönemi geçirdiği denemelerdir (**Carnevale ve Ginther, 1995**).

Sonuç

Atlarda invitro fertilizasyon çalışmalarının başarı oranları oldukça düşüktür. GIFT uygulamaları hem rutinde hem de klinik araştırmalarda başarıyla kullanılmaktadır. Rutin uygulamalarda kullanılması fertilitate problemi olan kısırlardan gebelik elde edilmesini sağlamaktadır. GIFT uygulamalarının klinik ve laboratuvar çalışmalarında kullanılmasıyla da oosit, sperm ve ovidukt arasındaki ilişkinin henüz anlaşılamayan özelliklerinin ortaya çıkarılmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Allen, W.R., Rowson, L.E.A., 1972.** Surgical and non-surgical egg transfer in horses. In: Proceedings of the 7th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Munich, Germany, pp. 484-487.
- Bezard, J., Magistrini, M., Duchamp, G., 1989.** Chronology of equine fertilization and embryonic development in vivo and iv vitro. *Equine Vet J.(Suppl.)* 8,105-110.
- Bezard, J., Palmer, E., 1992.** In vitro maturation old horse oocytes from slaughtered ovaries. In: Proceedings of the 12th International Congress of Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands p.315.
- Bracher, V., Parlavliet, J., Fazeli, A.R., 1993.** Repeated transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in the mare. *Equine Vet J.(Supp)* 15, 75-79.
- Bruck, I., Raun, K., Synnestvedt, B., 1992.** Follicle aspiration in the mare using transvaginal ultrasound guided technique. *Theriogenology* 24,58-59.
- Carnevale, E.M., Ginther, O.J., 1993.** Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. *J. Equine Vet. Sci.* 13, 331-333.
- Carnevale, E.M., Griffin, P.G., Ginther, O.J., 1993.** Age-associated subfertility before entry of embryos into the uterus in mares. *Equine Vet. J. Suppl.* 15, 31-35
- Carnevale, E.M., Ginther, O.J., 1995.** Defective Oocytes as a Cause of Subfertility in Old Mares. *Biol Reprod Mono.* 1, 209-214.
- Carnevale, E.M., 1996.** Gamete Intrafollopian Transfer. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.*; 12(1),47-60.
- Carnevale, E.M., Uson, M., Bozzola, J.J., King, S.S., Schmitt, S.J., Gates, H.D., 1999.** Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. *Theriogenology* 51, 299-305.
- Carnevale, E.M., 2004.** Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Animal Reproduction Science* 82, 617-624.
- Choi, Y.H., Chung, Y.G., Seidel, G.E., Squires, E.L., 2001.** Developmental capacity of equine oocytes matured and cultured in equine trophoblast-conditioned media. *Theriogenology* 56, 329-339.
- Cook, N.L., Squires, E.L., Ray, B.S., Cook, V.M., Jasko, D.J., 1993.** Transvaginal ultrasonically-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Vet J.(suppl.)* 15, 71-74.
- Coutinho da Silva, M.A., 2008.** When should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology.* 70(3), 441-444.
- Ginther, O.J., 1992.** Reproductive biology of the mare, ed. 2. Cross Planins, WI, Equiservices.
- Hinrichs, K., Kenney, D.F., Kenney, R.M., 1990.** Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology* 34, 107-112.
- Jacobson, C.C., Choi, Y.H., Hayden, S.S., Hinrichs, K., 2010.** Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology.* 73(8), 1116-1126.
- McKinnon, A.O., Carnevale, E.M., Squires, E.L., Voss, J.L., Seidel Jr., G.E., 1988.** Heterogenous and xenogenous fertilization of in vivo matured equine oocytes. *J. Equine Vet. Sci.* 8, 143-147.
- McKinnon, A.O., Squires, E.L., 1988.** Equine embryo transfer. *Vet Clin North Am: Equine Prac.* 4, 305-333.
- Meintjes, M., Bellow, E.S., Paul, J.B., 1995.** Transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval in cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. *Biol prerod Monograph Series.* 1, 281-287.
- Nelson, JR, Corson, SL, Batzer, FR, Gocial, B, Huppert, L, Go, KJ, Maislin, G., 1993.** Predicting succes of gamete intrafallopian transfer. *Fertil. Steril.* 60, 116-122.
- Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, T.A.M., 1988.** Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 37, 751-768.
- Ransom, MX, Corsan, GH, Garcia, AJ, Doherty, KA, Kemmann, E., 1994.** Tubal selection for gamete intrafallopian transfer. *Fertil. Steril.*; 61, 386-389.
- Rantanen, N.W., McKinnon, A.O., 1998.** Equine Diagnostic Ultrasonography. Willams and Wilkins.
- Squires, E.L., Barnes, C.K., Rowley, H.S., 1989.** Effect of uterine fluid and volume of extender on fertility. In: Proceedings of the 35th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Boston, MA pp: 25-30.
- Squires, E.L., Cook, N.L., 1996.** Transvaginal Aspiration. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.* 12(1), 13-29.

Squires, E.L., 1996. Maturation and fertilization of equine oocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 12(1), 31-45.

Squires, E.L., Cook N.L., 1998. Ultrasound-Guided Follicular Aspiration. In: *Equine Diagnostic Ultrasonography* Eds: Rantanen NW, McKinnon AO. Williams & Wilkins Maryland pp: 213-220.

Squires, E. J., Carnevale, E. M., McCue, P. M., Bruemmer, J. E., 2003. Embryonic technologies in the horse. *Theriogenology* 51, 151-170.

Vogelsang, M.M., Kreider, J.L., Bowen, M.J., 1988. Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology* 29, 1007-1018.