

MICROTECNIAS: TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

BIOTECNOLOGIA APLICADA A LA PRODUCCION ANIMAL

Clara E. Larocca¹
Alicia Postiglioni²
Sergio Kmaid³
Miguel De Bethencourt⁴
Juan Calvo⁵

RESUMEN

La Biotecnología aplicada a la Producción Animal, hoy se inclina hacia la manipulación de embriones. En la Facultad de Veterinaria, se han comenzado a standardizar técnicas en donde se manipula material genético; T.E., fertilización "in vitro", control citogenético de donantes, sexaje de embriones.

Los cariotipos de las donantes fueron normales con patrones de bandas características de la especie. La complejidad de las técnicas citogenéticas para sexaje de embriones se fueron superando gracias al uso de fijadores a bajas temperaturas (4°C).

Los resultados obtenidos en fertilización "in vitro" fueron:

De ovocitos seleccionados con calidades A y B, se logró dividir el 36,36% a las 48 horas de los cuales se obtuvo el 9.1% con más de 5 células. Este trabajo se desarrolló siguiendo los lineamientos del Dr. I. Shimohira del Fukushima National Livestock Breeding Station en Japón.

I. INTRODUCCION

Un equipo multidisciplinario intercatedras de la Facultad de Veterinaria, con el

-
- ¹ Médico Veterinario. Asistente de Teriogenología
² Licenciada. Encargada de la Cátedra de Zootecnia General y Genética
³ Br. Ayudante de Investigación
⁴ Br. Ayudante de Investigación
⁵ Br. Asistente de Histología

c.c.3.1

apoyo de la Universidad de la República, estamos llevando a cabo desde setiembre de 1988 un Proyecto de Investigación, que se inscribe dentro de la Biotecnología Aplicada a la Producción Animal. Contiene un programa de control de donantes y dos técnicas, el sexaje de embriones y la fertilización in vitro (FIV), las cuales han tenido una vertiginosa evolución en los últimos cinco años.

Los objetivos de nuestro Proyecto son, por un lado, estandarizar estas técnicas a efectos de su aplicación en la producción, así como aportar modestamente al perfeccionamiento de ellas, o sea colaborar a integrar a nuestro país y a nuestra Facultad, en la medida de las posibilidades, al proceso mundial de desarrollo de la Biotecnología.

En esta comunicación en el ámbito de nuestra profesión veterinaria expondremos nuestra metodología de trabajo, así como los resultados preliminares alcanzados en el primer experimento de FIV de oocitos bovinos en el cual por vez primera en el país se obtuvieron embriones de más de cinco células efectuándose todo el proceso de maduración, fertilización y desarrollo en cultivo, en condiciones de laboratorio. Esto fue posible gracias a la ayuda invaluable del Dr. Ituso Shimohira experto que nos asesoró durante los meses de febrero, marzo y abril del presente año.

A efectos de una mayor claridad expondremos por separado los dos subproyectos.

II. CONTROL CITOGENETICO DE DONANTES Y SEXAJE DE EMBRIONES

DOS ESTRATEGIAS EN LA MANIPULACION DE EMBRIONES

Recientes avances biotecnológicos logrados dentro de la producción animal, hoy se han encausado en investigaciones relacionadas con la manipulación de embriones.

Las técnicas modernas reproductivas con que nos enfrentamos (I.A., transferencia de embriones, fertilización "in vitro", sexaje de embriones) permitirán obtener ventajas dentro de la mejora genética de nuestros animales de interés pecuario. Estas técnicas reproductivas resultarán de gran interés al productor, siempre que estén evaluadas por un programa de selección eficaz, cuyos objetivos técnicos y económicos se encuentren claramente definidos. Por un lado, se debe tener un buen conocimiento del valor genético de los animales reproductores y por otro de la rápida difusión del genoma de estos animales dentro de la población. (Colleau, 1988).

Evidentemente, las hembras utilizadas como donantes en los centros de transferencia, deben poseer un valor genético reproductivo sobresaliente, debiendo ser controladas por análisis cariotípicos, ya que, siempre que se quiera transferir y/o amplificar material genético de machos o hembras de características relevantes en las poblaciones, debe evitarse el riesgo de extender anomalías cromosómicas dentro de estas nuevas poblaciones creadas por la Biotecnología (Gustavsson, 1980; Cacheiro y Hayes, 1983; King, 1985).

En cuanto al sexaje precoz de embriones, ésta es una tecnología que deberá desarrollarse en todo programa de manipulación de embriones, a nivel productivo, ya que sus resultados serán beneficiosos según la prueba de selección que se aplique a los nuevos rodeos.

La predeterminación del sexo de embriones obtenidos por transferencia o fertilización in vitro se podrá lograr al inseminar donantes con una población gamética homogénea, tanto de cromosomas X como de cromosomas Y (Bondiolo y col. 1989). Actualmente el método de sexaje de embriones, previo a su implantación en una vaca seleccionada como receptora, es el que hoy se está perfeccionando para lograr llevarlo a centros de T.E.

La identificación de cromosomas sexuales (cariotipo) la cuantificación de diferencias entre los porcentajes de desarrollo entre embriones machos y hembras, la detección de antígenos HY específicos, la determinación de corpúsculo de Barr, corresponden a las primeras técnicas probadas para lograr el sexaje de embriones previa a la transferencia (King, 1984; Iwasaki, 1988).

Avances en la tecnología del ADN_r permite hoy emprender la problemática del sexaje de embriones en bovinos por medio de la obtención de sondas específicas de ADN en el cromosoma Y (Leonard y col., 1987; Ellis y col., 1988; Bondiolo y col. 1989) aunque se ha encontrado localización de sondas específicas del cromosoma Y, en cromosomas autosómicos (Sinclair, A. y col., 1989).

Con respecto a la confiabilidad en los resultados que nos brindan las técnicas de sexaje de embriones, los métodos citogenéticos, a pesar de ser los más dificultosos en el desarrollo técnico, son los que presentan una confiabilidad del 100%. (Cotinot y col., 1988)

El propósito de esta comunicación preliminar es de presentar los recientes avances técnicos logrados en dos puntuales básicos dentro de la manipulación de embriones:

- a) controlar ausencia de aberraciones cromosómicas, en aquellos materiales genéticos manipulados en beneficio de su amplificación en las nuevas poblaciones;
- b) lograr avances técnicos en cuanto a la manipulación de embriones con fines a su determinación del sexo además de detectar anomalías cromosómicas en dichos embriones (Long y Williams, 1978)

METODOLOGIA

Se estudiaron 3 hembras Hereford destinadas a la transferencia de embriones del Campo Experimental N°1 de la Facultad de Veterinaria (Migues). Los estudios cromosómicos se lograron en el Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Veterinaria.

El medio de cultivo con mayor rendimiento corresponde al RPMI 1640 (Sigma), complementado con suero fetal bovino, fitohemaglutinina, antibiótico y anticoagulante (heparina).

Las células se dejan crecer 72 horas usando un inhibidor de la mitosis, la colchicina, como forma de detener el ciclo celular.

Técnicas de bandas C y G se experimentan para homologar pares cromosómicos.

Se comienza la manipulación de embriones para lograr desarrollar las técnicas de sexaje por métodos citogenéticos.

Se utilizan los embriones bovinos obtenidos por fertilización "in vitro" en la Facultad de Veterinaria, en estadio de dos a cuatro células (Iwasaki y col., 1988). Estos embriones bovinos (entre 6-10 por experimento) se cultivan en medio 199RCM estéril suplementado con antibiótico y colchicina durante 4 horas en estufa a 39°C atm. 5% y 95% CO₂. Esta sobrevida del embrión se desarrolla sobre gota de aceite de parafina líquida, en cajas de Petri estériles (5 cm). Luego se procede a la digestión de la membrana pelúcida, por medio del uso de enzimas proteolíticas (pronasa 0.5%). Una vez que ésta se debilita (4 min. se procede al choque hipotónico con KCL o.o 75M. Siguiendo el protocolo de Iwasaki (1989) se procede a 2 fijaciones. La primera fijación se consigue transfiriendo el embrión a una solución (8:5:15:) ácido acético, metanol, agua destilada, a 4°C (Long y Williams 1978), durante 3 min. Rápidamente se pasa al segundo fijador (3:1) metanol, ácido acético, durante 10 min. Se procede a hacer el extendido en placas de vidrio prelimpiadas y se colorean con Giemsa 4%.

RESULTADOS Y DISCUSION

El complemento cromosómico en las 3 hembras estudiadas revela un número diploide de 60 cromosomas formados por 29 pares de autosomas acrocéntricos y un par XX de cromosomas submetacéntricos, en la totalidad de las células analizadas. Las técnicas de bandeado C y G nos permiten descartar la presencia de alteraciones estructurales en las observaciones realizadas. Cacheiro y Hayes (1983) encuentran una traslocación Robertsoniana en 14 donantes seleccionadas para en-

trar en un programa de T.E. King y Linares (1983) documenta anomalías cromosómicas en 3 de 11 vacas superovuladas e inseminadas para actuar como donantes.

Nuestros resultados fueron favorables aunque la muestra estudiada fue baja, no pudiendo todavía, sacar más que conclusiones individuales.

Los experimentos realizados con los métodos citogenéticos para lograr el sexaje de embriones, dependen de la edad del embrión (Shimohira, com.personal). Las experiencias llevadas a cabo, valoran los sucesivos pasos de la técnica, especialmente el serio problema de la fijación. Este paso fundamental para la observación de células metafásicas en el tejido embrionario, se va superando frente a la utilización de bajas temperaturas durante la manipulación de embriones.

Actualmente, se están intentando perfeccionar estas técnicas para ponerla en práctica pero todavía la incidencia no es representativa. Picard y col. (1985) documenta casos de obtención de terneros a partir de demiembriones sexados y congelados.

A pesar de las dificultades que abordan estas técnicas citogenéticas, son las que presentan una confiabilidad del 100% en el diagnóstico de la determinación del sexo.

Técnicas moleculares para la obtención de sondas de ADN específicas del cromosoma y bovino, así como la hibridación "in situ" sobre el cromosoma Y son métodos técnicamente sencillos, pero con ciertos riesgos en el diagnóstico.

III. FERTILIZACIÓN IN VITRO

III.1 Antecedentes

Una fuente de embriones económica es de suma importancia en el bovino para aplicar estrategias de mejora ganadera y para la aplicación de nuevas tecnologías genéticas. Hoy es posible producir completamente in vitro, en el laboratorio embriones en todas las etapas de desarrollo desde una célula hasta los estadios transferibles, partiendo de semen fresco o congelado y de ovocitos primarios provenientes de folículos inmaduros.

La FIV es una fuente muy barata de suministrar cigotos para investigaciones que no se pueden realizar en la producción como por ej: congelación, división, sexaje de embriones así como modificaciones del genoma, quimeras, animales transgénicos, etc.

El primer ternero obtenido por FIV fue producido por Brackett en 1981, utilizando ovocitos maduros in vivo provenientes de vacas superovuladas. En 1984 el Dr. Hanada obtiene un ternero a partir de ovocitos maduros in vitro y posteriormente fertilizados. En 1986 Parrish reporta el primer ternero nacido de FIV utilizando semen congelado. En 1988 en Japón se han gestado 70 vacas con esta técnica.

Los ovocitos primarios han sido madurados fuera del folículo utilizando diversos medios de cultivo, con o sin la ayuda de hormonas gonadotrópicas y células de la granulosa de folículos maduros o de tapiz de oviducto. (Crister, 1986; Lu, 1987; Au and Greve, 1987), y también dentro de los folículos (Plachot, 1978; Moor, 1980).

Excepto en un reporte (Leibfried, 1987), el porcentaje de ovocitos fertilizados que llegan a estadios avanzados de desarrollo (12 a 38%), no sobrepasa el 45% de los valores reportados cuando se realiza la fertilización in vitro de ovocitos madurados in vivo, o sea recolectados posteriormente a la superovulación de las vacas (Leibfried-Rutledge, 1989). Estos resultados insuficientes obliga a centrar las investigaciones en los sistemas de cultivo.

La necesidad de usar la FIV combinada con otras técnicas biotecnológicas hace más práctico y conveniente el uso del semen congelado. El swim-up combinado con la adición de heparina al medio para el semen a efectos de inducir la capacitación, logra altas frecuencias de fertilización. (Parrish, 1986; Parrish, 1988). La adición de cafeína al medio de Brackett y Oiphant, (1975) más heparina también logra elevados porcentajes de fertilización.

El objetivo de este trabajo es desarrollar la técnica de FIV en nuestra Facultad de Veterinaria a efectos de:

- 1) estar en condiciones de aplicarla en breve plazo como prueba biológica de capacidad fertilizante de eyaculados de machos de distintas especies productivas.
- 2) En la medida que se logre estandarizar la técnica se podrá brindar al medio embriones baratos para transferencia.
- 3) Ofertar embriones en todas las etapas de desarrollo como material de investigación, valioso y a la vez barato a la comunidad científica.

III.2 Metodología utilizada

En nuestro primer experimento, el cual hoy comunicamos, utilizamos el protocolo de trabajo del Dr. Shimohira, que es el protocolo de trabajo de Fukushima National Livestock Breeding Station en Japón.

a. Colección de oocitos a partir de folículos inmaduros

Los oocitos se obtienen de ovarios recolectados en el frigorífico inmediatamente después de ser sacrificada la vaca, los cuales se mantienen y son transportados en el menor tiempo posible al laboratorio en termos con solución salina fisiológica (0,9% Cl Na) a 37°C. Se adiciona a la solución Penicilina (100.000 U.i./l) y estreptomocina (100 mgr/l).

Una vez en el laboratorio se mantienen los ovarios a 37°C en solución salina fisiológica.

Antes de aspirar los oocitos se cuentan los folículos con diámetro entre 1 y 5 mm.

Los oocitos se aspiran mediante uso de jeringas de 5 ml. y agujas 20 G, las cuales contienen 2 ml. de PBB modificada + 1% de suero de ternero inactivado (ST) y Penicilina-estreptomocina.

Se debe puncionar el folículo desde el parénquima ovárico y aspirar el contenido de 3 o 4 folículos por vez.

El contenido de las jeringas se vierten en tubos de ensayo mantenidos en Baño María a 37°C.

Tanto los medios de mantenimiento y cultivo como todo el material debe estar rigurosamente estéril en todas las manipulaciones de la técnica.

b. Selección y maduración de oocitos inmaduros

Se vierte el contenido de los tubos en Cajas de Petri grandes (90 mm. diámetro) previamente reticuladas en su parte inferior y con ayuda de un microscopio estereoscópico se procede a traspasar los oocitos con pipetas Pasteur de punta fina a una Caja de Petri chica conteniendo PBS modificada +ST+Antibióticos y cubierta su superficie con aceite de parafina. Se lavan los oocitos 2 veces en sucesivas Cajas de Petri.

Luego se traspasan los oocitos a una nueva Caja de Petri chica conteniendo el medio de maduración. Se lavan tres veces y se clasifican en:

- A- Oocitos completamente rodeados por el cúmulo.
- B- Oocitos parcialmente rodeados.
- C- Oocitos desnudos.
- D- Oocitos rodeados de fibrina (se descartan).

Como medio de maduración utilizamos TCM 199 + Buffer Hepes (25 mM) +ST 5% + Penicilina Estreptomocina (100.000 U.I./l, 100 mg./l).

Las cajas con gotas de medio de maduración se cubren con aceite de parafina, y una vez que contienen los oocitos a razón de 10/gota se incuban a 38,5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 20 horas.

c. Preparación del semen

Para la fertilización in vitro utilizamos en el tratamiento del semen la solución

BO (Brackett y Olipahnt), y el TMC 199 para el cultivo de los oocitos inseminados in vitro.

En este experimento nosotros utilizamos pelets congelados por nosotros y previamente a su uso se efectuó un control completo.

6 pastillas de semen congelado se descongelaron (semen de toro holando) en un tubo de ensayo conteniendo 2 ml. de solución BO de lavado (BO+ cafeína benzoato de sodio (10 mM + heparina 20 microgramos/ml) en Baño María a 37°C. Se procedió luego a agregar 6 ml de la solución de lavado y se efectuaron dos lavados mediante centrifugación a 485 g 5 minutos c/u.

Una vez que se remueve el sobrenadante se agrega al sedimento de 0,5 a 0,8 ml de solución de BO de lavado, se extraen 50 microlitros de la solución de esperma a efectos de realizar el conteo en cámara.

Una vez realizado el conteo se ajusta la concentración (agregando solución BO de dilución), a la concentración deseada de $12,5 \times 10^6$ espermias / ml.

Se preparan cajas de Petri chicas con 4 gotas de 100 microlitros de semen diluido bajo aceite de parafina.

El BO de dilución está compuesto por 10 ml de solución BO + 200 mgr. de albúmina de suero bovino fracción 5 (ASB)

En la preparación de los medios de cultivo contamos con la colaboración invaluable de la Dra. Elia Muñoz de Pesce.

d. Fertilización

Se procede a valorar el grado de maduración de los oocitos de acuerdo a la expansión del cúmulus. Luego se retiran del medio de maduración se lavan 3 veces con solución BO DE LAVADO DE OOCITOS (20 ml sol.BO+ 200 mg de ASB) y se colocan en las gotas con la suspensión de espermias en número de 10 por gota.

Se incuban durante 5 horas a 38,5°C en atmósfera de 5% de CO₂.

e. Recuperación de los oocitos inseminados y cultivo para el desarrollo

Se extraen los oocitos de las gotas con semen cuidando que el diámetro de la pipeta Pasteur sea el adecuado para no desnudarlos. Se lavan 3 veces en TCM 199 + 5% ST + Antibióticos y se transfieren a las cajas donde realizaron su maduración, previa renovación del medio de desarrollo.

Se incuban durante 48 horas.

f. Clasificación de los embriones

Después de las 48 horas de cultivo se desprenden los oocitos (divididos y no divididos) de los cúmulus con pipeta Pasteur de diámetro apenas mayor que el de la célula, y se transfieren todos a una gota para su clasificación en:

I. Embriones con más de 5 células

II. Embriones de 2-4 células

III. Monocelulares

IV. Degenerados

Los embriones de más de 5 células se colocan en la gota que contiene mayor cantidad de cúmulus y los otros en gotas contiguas. Después se renueva el medio dentro de las gotas.

Se continúa el cultivo durante 10-11 días más cambiando el medio cada 48 horas, controlando el desarrollo de los embriones todos los días, y 2 veces al día se golpea suavemente el borde de las cajas para que los embriones no se adhieran a los cúmulus.

III.3 Resultados y discusión

En este primer experimento aspiramos un total de 69 oocitos, provenientes

de 15 ovarios, comprendidos en las siguientes categorías:

A + B = 55 oocitos

C = 14 oocitos

TOTAL = 69 oocitos

Cuando efectuamos el control y la clasificación a las 45 horas de haber sido fertilizados in vitro encontramos 25 divididos, 20 embriones entre 2 y 4 células y 5 embriones con más de 5 células. Encontramos 39 monocelulares y 5 degenerados.

En virtud de que no pudimos fijar una muestra a las 20 horas sólo podemos tener como criterio de fertilización la división y los degenerados.

El número de oocitos fertilizados es siempre mayor que el de los divididos ya que muchos oocitos penetrados por el esperma no llegan a dividirse.

CUADRO 1. Resultados de la F.I.V.

| Categorías | Nº oocitos inseminados | 2-3 cel. | +de 5 cel. | monoc. | degen. |
|------------|---------------------------|----------|------------|--------|--------|
| A + B | 55 | 15 | 5 | 30 | 5 |
| C | 14 | 0 | 0 | 14 | 0 |
| TOTAL | 69 | 15 | 5 | 44 | 5 |

De acuerdo con nuestras observaciones se fertilizaron 25 oocitos de los 69 inseminados (36,2%), se dividieron 20 (28,9%), de los cuales tenían 5 (7,2%) más de cinco células, o sea con posibilidades de desarrollarse mórulas compactas o blastocitos.

Considerando los oocitos A y B o sea los de buena calidad, se fertilizaron el 45,4%, se dividieron el 36,3% de los cuales con más de 5 células el 9%.

No creemos que sea el momento de comparar nuestros resultados con los de otros investigadores por la etapa en que nos encontramos, sobre todo en este primer resultado. Podemos sí citar como marco de referencia los resultados comunicados por el Dr. Itsuo Shimohira quien obtuvo en tres experimentos en el año 1988 un promedio de 17% embriones con más de 5 células y los resultados de Kim, Ellington y Foote (1985), quienes obtuvieron un 35% de embriones divididos de 2 a 8 células.

Hoy podremos mostrar en un video los 5 primeros embriones bovinos con más de 5 células obtenidos en nuestro país por la fertilización in vitro.

SUMMARY

ADVANCES IN BIOTECHNOLOGIES OF ANIMAL PRODUCTION ARE RELATED TO EMBRYOS MANIPULATION. The standarization of several techniques as: embryos transfer, "in vitro" fertilization, cytogenetics of donants cows, sexing of embryos, have begun in Facultad de Veterinaria.

The karyotyping of donants were normals with the characteristic patterns of bands of the species. The complex cytogenetics techniques to determine the sex of embryos

prior to transfer to recipients are in advance by successive probes, using fixative at low temperatures (4°C). The results of "in vitro" fertilization were. The 36.36% of the selected oocytes with A and B qualities, were divided, after 48 horas of incubation, and it had been collected 9.1% with more than 5 cells.

This work was supported with the guide of Dr. I. Shimohira for the Fukushima National Livestock Breeding Station in Japan.

BIBLIOGRAFIA

- BONDIOLI, K.R.; ELLIS, S.B.; PRYOS, J.H.; WILLIAMS M.W. & HARPOLD, H.M. The use of male specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 31: (1) 95-103. (1989)
- BRACKETT, B.G. and OLIPHANT, G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12:260-274 (1975).
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D. BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F. and DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-158 (1982).
- CACHEIRO, N.L y HAYES, R. Incidence of Robertsonian translocations in donor cows entering an embryo transfer program. *Theriogenology*. 19: (1) 117. (1983)
- CRISTER, M.S.; LEIB RIED RUTLEDGE, M.L.; EYESTONE, W.E.; NORTHEY, D.L., and FIRST, N.L. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology* 25:150 abst. (1986)
- COLLEAU, J. Contribution des nouvelles techniques de reproduction a la selection animale. *Biofutur*. Juin 9-13. 1988
- COTINOT, C.M.; KIRZENBAUM, M.; VAIMAN, M.; FELLOUS, M. Les sexage des embryons: vers une modification du sexe ratio, *Biofutur*. Juin 33-37 (1988)
- GUSTAVSSON, I. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals - a review. 1980. Sonderdruck aus *Zeitschrift fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie* Bd. 97.H.3,S. 176-195.
- IWASAKI, S.; SHIOYA, YSUO; HANADA, AKIRA & NAKAHARA, T. Chromosome preparation from 2-ce 1 bovine embryos derived from follicular oocytes fertilized in vitro *Jpn J. Anim. Reprod.* 34: (2) 79=83. 1988
- KING, W.A. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology* 21: (1) 7-17. 1984.
- KING, W.A. Intrinsic embryonic factors that may affect survival after transfer. *Theriogenology*. 23: (1) 161-174. 1985
- KIM, C.I.; ELLINGTON, S.; FOOTU, R.H. In vitro maturation Fertilization and development of bovine oocytes *Theriogenology* 31: 1. 210 (1989)
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L. and FIRST N.L. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 36:376-383 (1987)
- LIEBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRISTER, E.S., PARRISH, J.J. and FIRST, N.L. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 31:1pp 61-66 (1989)
- LEONARD, M.; KIRSZENBAUM, M.; COTINOT, C.; CHESNE, P.; HEYMAN, Y.; STINNAKRE, M.G.; BISHOP, C.; DE LOUIS, C.; VAIMAN, M.; FELLOWS, M. 1987
- LONG, S.E. & WILLIAMS, C. Chromosomal abnormalities in ova and zygotes from normal ewes mated to normal rams. *Vet. Rec.* 102: 153. 1978
- PARRISH, J.J.; SUSKO- PARRISH, J.L.; LEBFRIED-RUTLEDGE, M.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N. Bovine in vitro fertilization with frozen thawed

- semen. Theriogenology 25:591-561. (1986)
- MOORE, R.M.; CAHILL, L.P., and STEWART, F. Ovarian stimulation on egg production as a limiting factor of egg transfer. Proc. (th int. Congr. of Animal Reproduction and Artificial insemination. Madrid 1:43.
- PICARD, L.; KING, W.A.; BETTERIDGE, K.J. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. Veterinary Record 117: 603-608. 1985
- PLACHOT, M. and MANDELBAUM, J. Comparative study of extra and intrafollicular hamster oocyte maturation. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 18:1237 1978.
- SINCLAIR, A.H.; FOSTER, J.W.; SPENCER, J.A.; PAGE, D.C.; GOODFELLOW, P.N.; MARSHALL, J.A. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupial. Nature 136: 780-783 1988
- XU, K.P.; GREVE, T. CALLESEN, H. and HYTTTEL, P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fertil. 81:501-504 1987